HAL
open science

Syndrome de Détresse Microcirculatoire et Mitochondriale dans le sepsis

Raphaël Favory

To cite this version:

Raphaël Favory. Syndrome de Détresse Microcirculatoire et Mitochondriale dans le sepsis. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2007. Français. NNT : . tel-00476831

HAL Id: tel-00476831

https://theses.hal.science/tel-00476831

Submitted on 27 Apr 2010

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.

Université du Droit et de la Santé – Lille II
Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Réanimation Médicale

présentée et soutenue publiquement
par

Raphaël FAVORY

Le 19 septembre 2007

Syndrome de Détresse Microcirculatoire et Mitochondriale dans le sepsis

Membres du Jury :

	Pr Daniel Mathieu (Lille)
Rapporteurs :	Dr Daniel De Backer (Bruxelles)
	Pr Eric Vicaut (Paris)
Examinateur :	Pr Michel Slama (Amiens)
Directeur de thèse :	Pr Rémi Nevière (Lille)

Université du Droit et de la Santé – Lille II
Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Réanimation Médicale

présentée et soutenue publiquement
par

Raphaël FAVORY

Le 19 septembre 2007

Syndrome de Détresse Microcirculatoire et Mitochondriale dans le sepsis

Membres du Jury :

	Pr Daniel Mathieu (Lille)
Rapporteurs :	Dr Daniel De Backer (Bruxelles)
	Pr Eric Vicaut (Paris)
Examinateur :	Pr Michel Slama (Amiens)
Directeur de thèse :	Pr Rémi Nevière (Lille)

Ce travail a été réalisé au sein :

- Du Département de Physiologie – EA 2689

Faculté de Médecine – Pôle Recherche
1, Place de Verdun
59045 Lille Cedex

- Du Service d'Urgences Respiratoires, Réanimation Médicale, Centre Régional d'Hyperbarie

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, service du Professeur Durocher
Boulevard du Professeur Jules Leclerc
59037 Lille Cedex

Sous la direction du Professeur Rémi Nevière

RESUME :

Le choc septique reste grévé d'une mortalité importante malgré les efforts de recherche expérimentale et clinique. Certains protocoles thérapeutiques cependant, ont permis ces dernières années de diminuer cette mortalité. Les mécanismes précis d'amélioration de ce pronostic sont inconnus. Il est possible que ce gain de survie soit du à une atténuation du Syndrome de Défaillance Microcirculatoire et Mitochondriale du Sepsis.

Les travaux réunis dans une première partie de ce volume ont permis de mieux caractériser l'effet de différentes thérapeutiques sur la microcirculation, la vasoréactivité. Thérapeutique annexe comme la sédation qui est utilisée en pratique clinique dans nos services de réanimation ou dans nos laboratoires chez nos animaux, qui perturbe la microcirculation. Thérapeutique directe comme la protéine C activée qui est déjà connue pour être bénéfique sur la microcirculation. La protéine C activée dans notre modèle de choc au LPS chez le rat a notamment un effet bénéfique microcirculatoire possiblement par une dégradation moindre du glycocalyx, le manteau endothélial. Ce produit a également un effet bénéfique sur la réponse vasculaire à la noradrénaline, restaurant cette réponse par rapport à des rats septiques. Une amélioration de la fonction vasculaire et cardiaque est constatée avec ce traitement, sans que l'on puisse affirmer que cette amélioration soit le fait d'une action directe bénéfique sur la microcirculation, la cellule musculaire lisse etc ou une amélioration globale de la réponse de l'organisme au choc : baisse concommittante de médiateurs comme le TNF-α, les dérivés nitrés, ou baisse concommitante du stress oxydatif.

Dans une deuxième partie du travail, l'implication de la mitochondrie par le biais de la modulation de facteurs proapoptotiques et de la dissipation du potentiel de membrane ouvre des perspectives pour mieux caractériser cette atteinte chez l'homme dans le futur. En effet moduler la dissipation du potentiel membranaire mitochondriale module chez l'animal la mortalité dans notre modèle.

Nous proposons pour l'avenir d'essayer de mieux caractériser ces anomalies chez l'homme.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Je les remercie d'avoir lu mon travail qui aurait pu être je le sais plus agréable à lire.

Je remercie mon directeur de thèse de tout mon cœur. Je sais que je l'ai parfois déçu du manque de temps que j'ai pu parfois donner au laboratoire. Rémi, tu m'as fait découvrir la recherche expérimentale, a dirigé la plupart de mes travaux. Je ne pense pas qu'un étudiant puisse rêver avoir un meilleur directeur de thèse que toi. Tu m'as fait progressé (j'espère…) dans ma façon d'appréhender la recherche et la logique en général.

Je remercie Monsieur Mathieu pour tout ce qu'il m'a appris et qu'il m'apprendera encore je l'espère. Les discussions passionnantes que nous pouvons avoir dans votre bureau et au lit du patient resteront toute ma vie des moments passionants.

Steve tu m'as manqué cette année. Ta thèse m'a beaucoup aidé et j'ai souvent pensé à toi pendant les heures difficiles. Merci pour les discussions passionnantes qu'on a pu avoir, binôme, et pour ce que tu m'as appris.

Je remercie Xavier, Brigitte, Robert, Sidi et toutes les personnes du labo.

Je remercie les services de réanimation, les laboratoires, tout leur personnel.

Je remercie mes parents pour leur soutien. Je ne vous dit pas assez souvent merci pour ce que vous avez fait pour moi et que je vous aime.

Je remercie Laurence, mon épouse, pour son amour, son soutien et sa patience malgré son année difficile et pour laquelle je suis extrèmement fier. Tu feras un très bon médecin. Je t'aime de tout mon cœur.

Je remercie ma fille, Marie, avec laquelle je n'ai joué cette année que quand j'étais « obligé ». Pardon ma fille, que j'aime plus que tout au monde, j'espère qu'un jour tu seras fière de ton papa. Moi, je suis très fier de ma fille, qui est la plus belle et la plus intelligente du monde. Je suis sur que si toi aussi tu vas à « l'école des docteurs » tu feras un bon médecin. Cette thèse t'est dédiée.

RESUME : **3**

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES **8**

LISTE DES ABBREVIATIONS **9**

MMDS MICROCIRCULATORY AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION SYNDROME **9**

INTRODUCTION : **10**

LE CHOC SEPTIQUE **12**

I. DEFINITION-EPIDEMIOLOGIE 12
II. SYNDROME CLINIQUE 14
1. Le choc septique est caractérisé par une diminution du tonus vasculaire. *14*
2. Il peut s'y associer une dysfonction myocardique *14*
III. PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE 16
1. L'inflammation est incontrôlée au cours du sepsis *16*
2. Une faillite du système immunitaire ? *16*
3. La théorie de Munford et Pugin : *17*
4. Et les neutrophiles ? *17*
5. Les patients meurrent-ils guéris de leur infection ? *17*
6. L'hibernation cellulaire est sans doute un mécanisme de dysfonction d'organe *18*

MICROCIRCULATION NORMALE **19**

I. ANATOMIE 19
II. HEMODYNAMIQUE / RHEOLOGIE 20
1. HEMODYNAMIQUE *20*
2. RHEOLOGIE *20*
a. Effet Fahraeus et effet Fahraeus-Linqvist 21
b. Répartition des flux de globules rouges au niveau des bifurcations 21
c. Au niveau capillaire 21
d. Rôle des globules blancs 22
III. DELIVRANCE DE L'OXYGENE 22
1. Délivrance locale en O_2 ..... *22*
2. Adaptation du flux microcirculatoire aux besoins *23*
a. Facteurs neurogènes 23
b. Facteurs humoraux 23
c. Autres facteurs 23

STRUCTURE ET FONCTIONS DES VAISSEAUX **24**

I. L'ENDOTHELIUM 25
1. ACTIONS DE L'ENDOTHELIUM SUR LE SANG *25*
a. Catalyse de la formation d'angiotensine II 25
b. Rôle dans la coagulation, et l'inflammation 26
c. Inhibition de l'agrégation plaquettaire par le NO et les prostacyclines 27
2. MODULATION DU TONUS VASCULAIRE *27*
a. Le NO 27
b. Pourquoi la régulation du tonus vasculaire est fondamentale ? 29
II. LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE 31
1. PROPRIETES CONTRACTILES DE LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE *31*
a. Déclenchement de la contraction 31
b. La contraction est lente mais soutenue 32
c. La vasomotion (automaticité) est la contraction rythmique de certains vaisseaux 32
III. LE GLYCOCALYX 34
1. COMPOSITION DU GLYCOCALIX[42] *35*
a. Protéoglycanes 35
b. Glycoprotéines 35
c. Les composant solubles 37
2. FONCTIONS DU GLYCOCALYX *37*
a. Rôle dans la perméabilité vasculaire 37
b. Rôle dans les interactions éléments figurés / endothélium 38
c. Rôle dans la rhéologie 38
d. Rôle de mécanotransduction 39
e. Rôle dans la protection vasculaire et d'orchestration de son environnement 39

3. LE GLYCOCALYX EN PHYSIOPATHOLOGIE ... 40
a. Le diabète ... 40
b. Autres pathologies ... 41
4. VISUALISATION DU GLYCOCALYX ... 41

ALTERATIONS CARDIOCIRCULATOIRES DANS LE SEPSIS ... 43

I. LA POMPE ... 43
1. Mécanismes supracellulaires ... 43
a. Substances cardiodépressives ... 43
b. Leucocytes et ROS ... 43
c. Anomalies de perfusion ... 44
2. Mécanismes cellulaires ... 44
a. Down-régulation des récepteurs β-adrénergiques ... 44
b. Calcium et myofilaments ... 44
c. Voie du NO et du péroxynitrite ... 45
d. Apoptose cardiaque ... 45
II. LES ANOMALIES HEMODYNAMIQUES REGIONALES LORS DU SEPSIS ... 46
1. La circulation coronaire ... 46
2. La circulation mésentérique ... 47
3. La circulation hépatique ... 47
4. La circulation rénale ... 48
5. La circulation cérébrale ... 48
6. La circulation musculaire squelettique ... 48
III. VOIES RESPONSABLES DES ANOMALIES DU TONUS VASCULAIRE ... 49
1. Voie du NO ... 50
2. Voie du monoxyde de carbone (CO) ... 51
3. Voie de la vasopressine ... 52
4. Voie de l'endothéline ... 52
5. Métabolites de l'acide arachidonique ... 53
6. CYTOKINES ... 54
7. STRESS OXYDATIF ... 55

DYSFONCTION MICROCIRCULATOIRE DU SEPSIS ... 56

I. ALTERATIONS ENDOTHELIALES ... 56
1. Altérations « physiques » ... 56
2. Modifications de la coagulation ... 57
3. Apoptose endothéliale ... 58
II. ALTERATION DE LA VASOREACTIVITE ARTERIOLAIRE ... 58
III. ALTERATION DE LA PERFUSION CAPILLAIRE ... 60
IV. RÉPONSE INFLAMMATOIRE VEINULAIRE ... 61
V. LE GLOBULE ROUGE ... 62
1. La déformabilité des globules rouges ... 62
2. Le NO transporté par l'Hémoglobine ... 62
3. Le calcium des GR ... 62
4. L'ATP ... 63
5. L'acide sialique membranaire ... 63
6. Les leucocytes ... 63
VI. DYSFONCTION MICROCIRCULATOIRE CHEZ L'HOMME ... 65
1. Techniques laser-doppler : l'hyperhémie fonctionnelle est altérée ... 65
a. La peau ... 65
b. Le muscle ... 66
2. Techniques d'imagerie par OPS ... 67
a. Les anomalies microcirculatoires sublinguales sont réversibles ... 67
b. La persistance d'anomalies microcirculatoires sub-linguales est corrélée à un mauvais pronostic ... 67
c. Les anomalies microcirculatoires sublinguales peuvent s'améliorer par des traitements ... 68
d. Les anomalies sublinguales existent aussi dans le contexte d'optimisation thérapeutique précoce (EGDT) . 68
e. Les anomalies de la microcirculation détectées par OPS sont hétérogènes suivant l'endroit étudié ... 69

SYNDROME DE DEFAILLANCE MICROCIRCULATOIRE ET MITOCHONDRIALE (MMDS) LORS DU SEPSIS ... 70

I. LA MICROCIRCULATION ENTRAINE UNE HYPOXIE ... 70
1. Notion d'unités microcirculatoires "fragiles" ... 70

2. Le « PO_2 gap » et le shunt microcirculatoire ... *71*
II. LA THEORIE DE LA CYTOPATHIE HYPOXIQUE ... 74
1. Les arguments dans les modèles animaux ... *74*
2. Les arguments chez l'homme ... *75*
3. Les mécanismes proposés : ... *75*
a. L'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) ... 75
b. L'inhibition du cytochrome a,a_3 par le NO ... 76
c. L'inhibition par le péroxynitrite des enzymes mitochondriales ... 76
d. L'hypothèse de la poly(ADP-ribose) polymérase ... 77
III. LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE EST ADAPTATIVE ... 78
IV. IMPACT DES MEDIATEURS INITIAUX DU CHOC SEPTIQUE SUR LA MITOCHONDRIE ... 81
1. Le TNF-α, voie des sphingolipides et apoptose ... *81*
2. Stress oxydatif ... *82*
3. Altérations métaboliques ... *83*
a. Cycle de l'urée ... 83
b. Métabolisme des lipides ... 83

RESULTATS ... 85

OBJECTIFS DU TRAVAIL ... 86

ARTICLE N°1 ... 87

ARTICLE N°2 ... 98

ARTICLE N°3 ... 106

ARTICLE N°4 ... 130

ARTICLE N°5 ... 138

ARTICLE N°6 ... 145

DISCUSSION ... 155

III. MODULATION DE LA MICROCIRCULATION ... 157
1. Effets de la sédation ... *157*
2. Effets de la protéine C activée ... *157*
a. Chez l'animal ... *157*
b. Chez l'homme ... *158*
IV. EFFETS CARDIOCIRCULATOIRES DE LA PROTEINE C ACTIVEE ... 159
1. Etudes animales ... *159*
2. Etudes humaines ... *161*
a. Modèles d'endotoxinemie chez le volontaire sain ... 161
b. Données en clinique humaine ... 162
III. DEFAILLANCE MICROCIRCULATOIRE OU MITOCHONDRIALE ? ... 163
IV. LES PROTOCOLES THERAPEUTIQUES RECENTS ONT-ILS ETE POSITIFS GRACE A LA MITOCHONDRIE ? ... 165
1. Early Goal Directed Therapy ... *165*
2. Contrôle strict de la glycémie ... *166*
V. FAUT-IL REANIMER LA MICROCIRCULATION ET COMMENT ? ... 167
1. la technique OPS sera-t-elle la méthode servant à réanimer la microcirculation demain ? ... *167*
2. La technique laser-doppler semble encore moins une bonne candidate pour la mesure et l'analyse rapide des signaux anormaux. ... *167*
3. Que penser de la technique de saturation tissulaire musculaire en O2 ? ... *167*
4. Quels objectifs de réanimation microcirculatoire ? ... *168*
VI. MODULATION DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL ... 168
VII. PERSPECTIVES : COMMENT PROUVER QUE L'ALTERATION DU POTENTIEL DE MEMBRANE DE LA MITOCHONDRIE EST LE MOTEUR DU SEPSIS ? ... 171
1. Il nous faut un modèle avec une pression artérielle normale ... *171*
2. Il nous faut une microcirculation la plus normale possible ... *171*
3. Il faut développer des techniques de mesure de potentiel de membrane mitochondrial ... *171*

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Définitions du sepsis selon l'ACPP/SCCM

Tableau II : Molécules dépendant du glycocalyx pour un fonctionnement opérationnel

Figure 1 : Nombre de publications sur microcirculation et sepsis depuis 1960 en anglais ou français citées dans Pubmed

Figure 2 : Nombre de publications sur mitochondrie et sepsis depuis 1960 en anglais ou français citées dans Pubmed

Figure 3: évolution du profil hémodynamique du choc septique d'après Dellinger

Figure 4: Profil hémodynamique et besoins en inotropes positifs dans le choc septique chez l'homme d'après Mebazaa

Figure 5: Activation du système immunitaire par le sepsis d'après Hotchkiss

Figure 6: Représentation de l'anatomie de la microcirculation

Figure 7: la viscosité du sang est le shear stress / shear rate soit F/A / dv/dx

Figure 8: Vue en microscopie électronique d'un vaisseau sanguin

Figure 9: Implication de la cellule endothéliale dans l'anticoagulation et la fibrinolyse d'après Vallet

Figure 10: La voie du NO et de ses composés dérivés entre cellule endothéliale et cellule musculaire lisse d'après Triggle.

Figure 11: représentation de la contraction d'une cellule musculaire lisse

Figure 12: Glycocalyx à la surface endothéliale

Figure 13: composition en glycoprotéines et glycosaminoglycanes du glycocalyx

Figure 14: principe d'estimation de l'épaisseur du glycocalyx en OPS d'après Neuwdorp

Figure 15: représentation de la séquence adhésion/aggrégation/rolling/diapédèse des leucocytes

Figure 16: altérations du globule rouge lors du sepsis d'après Piagnerelli

Figure 17: spectrophotométrie de fluorescence du NADH d'après Ince

Figure 18: Différence de « PO2 gap » dans l'intestin entre un modèle de choc hémorragique et un choc endotoxinique chez le porc.

Figure 19: Modèle de MMDS d'après Ince

LISTE DES ABBREVIATIONS

MMDS microcirculatory and mitochondrial dysfunction syndrome

FC fréquence cardiaque

FR fréquence respiratoire

SIRS Systemic Inflammation Response Syndrome

TNF-α Tumor Necrosis Factor alpha

TLR-4 Toll Like Receptor 4

CARS Compensatory Antiinflamatory Response Syndrome

Th-1, 2 Type 1 helper cell

IL-x Interleukine x

ROS Reactive Oxygen Species : espèces réactives de l'oxygène

GR globule rouge

ATP Adénosine Tri Phosphate

NO Nitric oxide : monoxyde d'azote

EDHF Endothelium Derived Hyperpolarizating Factor

TFPI Tissue Factor Pathway Inhibitor

AT III: antithrombine 3

SOD Super Oxyde Dismutase

GAG Glycosaminoglycanes

OPS Orthogonal Polarisating System

eNOS, iNOS NOS endothéliale, NOS inductible

CO monoxyde de carbone

HO-1 Hème-oxygénase de type 1

EGDT Early goal directed therapy

LPS Lipopolysaccharide

CLP Cecal Ligature Punction

INTRODUCTION :

Le choc septique reste grevé d'une mortalité importante malgré une meilleure compréhension de sa physiopathologie. De nombreuses thérapeutiques se sont révélées inefficaces voire délétères ces dernières décennies. La modulation de « l'orage proinflammatoire » par exemple, s'est révélée être un échec. Le **facteur temps** par contre, s'est avéré prépondérant dans le gain de survie notable dans la célèbre étude de Rivers de 2001[1], en agissant en amont de l'installation de défaillances d'organes supplémentaires. Lors de ces dernières années, la prise de conscience qu'une « macrocirculation normale » n'était pas forcément une garantie de « microcirculation normale », définissant ce qu'on appelle un **choc « cryptique »** et que les anomalies microcirculatoires pouvaient être un marqueur pronostic prépondérant chez le patient en état de choc septique, ont ouvert le champ à une expérimentation de plus en plus étoffée et poussée sur **les atteintes microcirculatoires et cellulaires (mitochondriales)** au cours du choc septique. Le but en est de mieux appréhender les anomalies retrouvées dans ce contexte, mais également de développer de **nouvelles stratégies thérapeutiques** avec des objectifs de réanimation « microcirculatoire » voire « cellulaire » pour améliorer le pronostic dans le choc septique.

Le problème majeur de cette réanimation microcirculatoire est le type de monitorage pertinent concernant la microcirculation d'une part -qui reste pour beaucoup à l'état de recherche dans peu de services- l'invasivité, l'interprétabilité des données d'autre part. L'idéal serait probablement d'utiliser des thérapeutiques « miracles », « à tête chercheuse », qui seraient bénéfiques aux endroits exacts de la microcirculation voire de la cellule et des organites pathologiques, sans que le clinicien soit obligé au lit du patient de reconnaître des anomalies compliquées ou difficiles à rechercher. D'autre part, **l'hétérogénéité des anomalies microcirculatoires et/ou cellulaires** peuvent rassurer ou inquiéter à tort le clinicien. Ce médicament miracle n'est évidemment pas encore inventé. Néanmoins, à y bien regarder, la précocité du remplissage vasculaire, la protéine C activée, l'hémisuccinate d'hydrocortisone, l'insulinothérapie intensive sont possiblement autant de thérapeutiques agissant de façon bénéfique (de façon consciente ou non de la part des médecins) sur le plan microcirculatoire et cellulaire. Quoiqu'il en soit, l'intérêt grandissant porté à cette entité physiopathologique qu'est le **MMDS (Microcirculatory and Mitochondrial Dysfunction Syndrome)** a motivé la réflexion et les travaux insérés dans ce volume.

Les figures 1 et 2 montrent l'augmentation du nombre de publications concernant la microcirculation et la mitochondrie dans le contexte du sepsis que ce soit chez l'animal ou chez l'homme et témoignent de cet intérêt grandissant pour ces deux dysfonctions septiques.

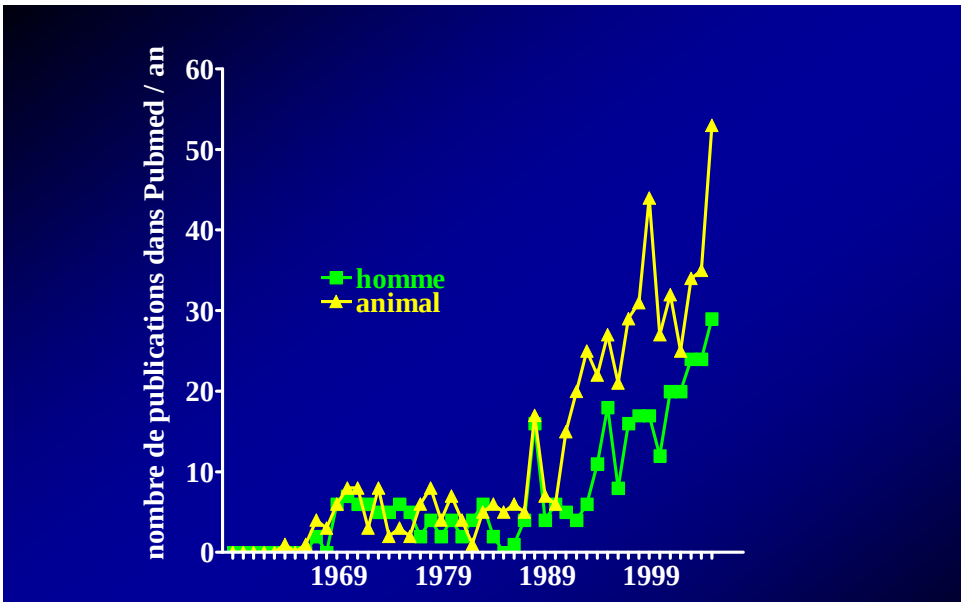


Figure 1: **Nombre de publications sur microcirculation et sepsis depuis 1960 en anglais ou français citées dans Pubmed**

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

LE CHOC SEPTIQUE

I. DEFINITION-EPIDEMIOLOGIE

L'étude de l'épidémiologie du sepsis pose d'emblée un **problème de définition**. Le terme de sepsis ayant été souvent utilisé de façon alternative avec choc septique, bactériémie[2]. Les médecins sont conscients de cette difficulté[3]. En 1992, un consensus mené par un groupe d'experts redéfini le sepsis comme la réponse systémique inflammatoire à l'infection[4]. Le tableau I reprend ces définitions.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

Le choc septique est donc la forme la plus sévère de réponse de l'organisme à uneinfection qui s'accompagne d'une hypotension réfractaire au remplissage seul.

Le deuxième écueil quand on s'intéresse à l'épidémiologie du sepsis est la **documentation de l'infection** dans les différentes études de la littérature. Dans une étude de surveillance ont note que 68% des patients ont au moins 2 critères de SIRS[5], dans une autre 44% chez 12759 patients[6] avec seulement pour celle-ci une documentation de 50% d'infection.

En France, chaque année voit environ 100 000 patients admis pour infection en unités de réanimation. La mortalité associée au sepsis se situe entre 30 et 50% avec une morbidité substantielle. Aux Etats-Unis, on considère que les soins coûtent 50 000$/patient[7], résultant en un coût de 17 billions de $/an[8]. C'est la deuxième cause de mortalité en unités de soins intensifs[9] (à part soins intensifs cardiologiques), et la dixième cause de mortalité aux Etats-Unis[10] et le sepsis réduit de façon importante la qualité de vie des survivants[11;12].

Dans une revue récente américaine[13], on notait une augmentation de la mortalité liée au sepsis et du nombre d'hospitalisation par an pour un sepsis, alors que la mortalité des patients ayant un sepsis décroît en parallèle.

Une étude slovène[14] concerne la mortalité comparée du sepsis au traumatisme : la survie en réanimation est de 60 versus 74%, la survie à l'hôpital 42 versus 62%, la survie cumulative à deux ans 33 versus 57%. Par contre, il n'y a pas de différence dans les morbidités étudiées : 60% des patients montrent des signes de dépression, 60 % ont des difficultés pour les gestes de la vie quotidienne, et 56 % se plaignent de douleurs chroniques. On voit donc qu'il est extrêmement difficile de calculer le coût financier qui doit concerner des paramètres divers et variés, et que le coût humain semble lui aussi énorme. Il est intéressant de noter que le sepsis semble être plus qu'un phénomène initial, si la mortalité est augmentée dans les semaines ou mois suivants le début du sepsis par rapport au traumatisme, c'est probablement qu'il bouleverse de façon profonde et durable des fonctions physiologiques importantes.

En France, l'étude EPISEPSIS[15] a été menée en 2001 sur une période de deux semaines : sur 3738 admissions, 546 (14,6%) étaient en sepsis sévère ou choc septique, dont 30% étaient acquis en réanimation. La mortalité est de 35% à 30 jours, 41,9% à 2 mois. Cette

mortalité était de 56% 10 ans avant et l'incidence du sepsis sévère était de 8,4**%. Cette tendance a donc l'air d'être internationale : plus de sepsis, donc plus de mortalité liée au sepsis, mais une mortalité du syndrome lui-même qui baisse.**

II. SYNDROME CLINIQUE

Weil et Shobin ont classés en 1971 les états de choc en :

- Hypovolémique (perte de volume intravasculaire)
- Cardiogénique (altération de la fonction pompe)
- Obstructif
- Distributif

Le choc distributif qu'on retrouve dans le choc septique est associé à une mauvaise distribution du volume intravasculaire avec des signes de dysfonction métabolique, mais contrairement aux trois autres types de choc, le débit cardiaque reste normal ou élevé.

1. Le choc septique est caractérisé par une diminution du tonus vasculaire.

Cette diminution s'accompagne d'une **vasoplégie intense** (résistances vasculaires systémiques effondrées) d'une part et d'une **diminution de la réponse pressive aux catécholamines** d'autre part. Cette diminution des résistances vasculaires systémiques a été corrélée à un plus mauvais pronostic[16]. La figure 3 montre l'évolution hémodynamique d'un choc septique d'après Dellinger[17].

2. Il peut s'y associer une dysfonction myocardique

Cette dysfonction cardiaque est parfois plus difficile à détecter cliniquement, ce d'autant que le débit cardiaque est en général augmenté[18]. La **dysfonction systolique** peut être présente très précocément dans l'histoire septique du patient et **concerne souvent les deux ventricules.**

L'existence d'une **dysfonction diastolique** est plus difficile à mettre en évidence. Cette dysfonction dure 5 à 7 jours dans les cas favorables avec un retour à une fonction cardiaque normale. La figure 4 montre d'après Mébazaa que seuls les patients avec saturation veineuse centrale abaissée en même temps que le débit cardiaque sont d'après lui à mettre sous traitement inotrope positif.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

III. PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE

Nous reprenons ici brièvement les points principaux d'une revue récente de Hotchkiss[19] sur la physiopathologie et le traitement du sepsis.

1. L'inflammation est incontrôlée au cours du sepsis

Une des premières théories concernant la physiopathologie du choc septique est celle de Lewis Thomas[20] qui soutenait que nos défenses contre l'infection sont si fortes que nous avons plus à craindre de cette réponse que des micro-organismes eux-mêmes. Cette **théorie**

de l'inflammation incontrôlée devait être tempérée par l'échec des thérapeutiques bloquant la cascade en amont : les corticoïdes (à forte dose)[21], l'ibuprofène, les anticorps anti-TNF-α[22]… En effet ces thérapeutiques qui avaient trouvé un écho dans des modèles animaux où l'inflammation était majeure, se révélèrent inefficaces une fois appliquées chez l'homme, sauf dans des contextes particuliers (méningococcémie par exemple).

Par ailleurs ces cytokines montrées du doigt au départ comme responsables de tous les maux peuvent aussi avoir des effets bénéfiques. Même **bloquer la cytokine sensée être la plus néfaste, le TNF-α, peut être délétère** dans certaines conditions chez l'animal[23] comme chez l'homme[24].

Bloquer l'endotoxine, composant de la paroi bactérienne des bactéries à Gram Négatif, est peut-être aussi une idée **trop simpliste**. En effet, si on étudie les souris qui ont une mutation du Toll-like Receptor 4 (TLR4), elles ont une résistance à l'endotoxine, certes, mais leur mortalité augmente lors d'un sepsis[25;26].

2. Une faillite du système immunitaire ?

Les patients ayant un sepsis ont une perte de l'immunisation retardée, une incapacité à guérir de l'infection et une prédisposition aux infections nosocomiales[27].

Le cours du sepsis se déroule selon un scénario où d'habitude, la phase initiale inflammatoire (SIRS) fait place à une phase antiinflammatoire (CARS).

Les lymphocytes peuvent adopter un profil proinflammatoire dit Th1 (type 1 helper cell) et sécréter des cytokines proinflammatoires type TNF-α, IL-1, Interferon-γ, IL-2, ou un profil antiinflammatoire dit Th2 et sécréter des cytokines antiinflammatoires de type IL-4 et IL-10.

Les facteurs exacts induisant l'un ou l'autre de ces phénotypes restent imprécis, mais il semble que garder ou avoir une réponse Th2 trop forte soit délétère aussi[28].

Il existe une anergie (par exemple tuberculinique), c'est-à-dire que les cellules T ne peuvent pas sécréter des cytokines ou proliférer quand elles rencontrent leur antigène.

En fait au cours du sepsis, si une cellule meurt par **nécrose**, la réponse va être une stimulation immunitaire et une augmentaton des défenses alors que si elle meurt par **apoptose**, elle va induire anergie et libération de cytokines antiinflammatoires[29]. Chez l'homme cette apoptose des cellules immunitaires qui se retrouve dans des séries autopsiques, est confirmée par l'analyse des lymphocytes circulants[30]. En même temps, chez l'animal prévenir l'apoptose lymphocytaire améliore la survie[31].

3. La théorie de Munford et Pugin :

Pour ces auteurs, **la réponse normale de l'organisme au stress est une activation des systèmes antiinflammatoires** en dehors du tissu infecté[32]. Dans cette théorie, la phase antiinflammatoire n'est pas une CARS. Elle n'est pas compensatrice, elle est d'emblée activée, prédominante, comme certains débuts de piste le laisse supposer. Dans ce cas, c'est la récupération d'une réponse inflammatoire normale qui servirait le pronostic des patients.

4. Et les neutrophiles ?

Jugés comme essentiels pour éradiquer le pathogène, les neutrophiles étaient également considérés comme délétères à cause de la sécrétion de radicaux libres de l'oxygène (ROS) et de protéases. Augmenter leur taux par des facteurs de croissance n'améliore pas le pronostic.

5. Les patients meurrent-ils guéris de leur infection ?

Des séries autopsiques suggèrent que l'erreur la plus évitable de décès des patients en sepsis est l'échec d'authentification de la cause et de son traitement par une chirurgie adaptée ou un traitement antibiotique bien conduit[33].

6. L'hibernation cellulaire est sans doute un mécanisme de dysfonction d'organe

Les séries autopsiques ne retrouvent que peu de cellules mortes dans le cœur, le rein, le foie alors que les dysfoncions de ces organes étaient importantes. La plupart des nécroses tubulaires rénales vont être temporaires. Le sepsis active peut-être des mécanismes qui induisent l'hibernation des cellules comme par exemple comme dans l'infarctus du myocarde.

Proposer une thérapeutique immunologique « sur mesure » au patient en fonction de la période pro ou antiinflammatoire dans laquelle il se situe pourrait être le début d'un réponse pour améliorer le pronostic du sepsis.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

MICROCIRCULATION NORMALE

I. ANATOMIE

Le terme de **microcirculation** fait référence à des vaisseaux de diamètre inférieur à 150µm.

La **partie proximale artériolaire** est subdivisée à chaque embranchement par des artérioles d'ordre croissant du 1er ordre (A1) d'environ 120µm au 4ième d'environ 10µm (A4).

Le **réseau capillaire** fait suite au réseau artériolaire et son diamètre varie de 3 à 7µm environ. Les capillaires sont généralement parallèles les uns aux autres et de nombreux capillaires transversaux joignent les capillaires contigus.

Enfin, le **réseau veinulaire** est de façon grossière le miroir du réseau artériolaire avec 20% de diamètre en plus pour des artérioles de même ordre d'embranchement.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

II. HEMODYNAMIQUE / RHEOLOGIE

1. HEMODYNAMIQUE

L'essentiel de la réduction de pression artério-veineuse se fait au niveau des artérioles de calibre <100µm, c'est-à-dire au niveau des artérioles d'ordre A3 et A4. L'onde de pression liée au pouls est conservée tout au long du lit microcirculatoire y compris au niveau veinulaire. Il existe de plus des fluctuations spontanées d'une fréquence de période de 1 à 10 secondes, qu'on nomme **vasomotion**.

A l'état basal, il existe une grande hétérogénéité de la distribution des vitesses des globules rouges (GR) dans le réseau microcirculatoire, y compris dans un capillaire donné dans le temps.

2. RHEOLOGIE

La viscosité du sang dépend des propriétés des GR :

- Les GR peuvent s'agréger les uns aux autres pour former des **rouleaux érythrocytaires**
- **Les GR ont une déformabilité qui peut varier selon les conditions**

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

a. Effet Fahraeus et effet Fahraeus-Linqvist

L'effet Fahraeus correspond au fait que les GR accumulés au centre du vaisseau ont une vitesse supérieure au plasma. Cela implique une baisse de l'hématocrite par rapport à la circulation systémique, puisqu'il y a moins de GR proportionnellement au plasma.

L'effet Fahraeus-Linqvist est la réduction de la viscosité apparente parce que le manchon plasmatique qui entoure les GR réduit l'énergie nécessaire à l'écoulement.

b. Répartition des flux de globules rouges au niveau des bifurcations

Parce qu'il y a un hétérogénéité des débits artériolaires, à chaque bifurcation du réseau microcirculatoire, la branche de plus fort débit recevra une proportion de globules rouges plus grande que l'autre. Cela induit une différence dans les valeurs d'hématocrites entre les différentes branches du réseau.

c. Au niveau capillaire

Au niveau du réseau capillaire, les interactions entre les propriétés rhéologiques du sang et les caractéristiques anatomiques du réseau vont être responsables de la répartition ultime des flux érythrocytaires.

Dans les capillaires, les GR se déplacent en file indienne. En fonction de la déformabilité des GR, du diamètre du capillaire et de la vitesse du flux qui entraînera le GR, il peut y avoir une grande hétérogénéité locale dont l'équilibre est complexe et fragile.

Selon le principe de régulation métabolique intrinsèque, la vasodilatation dans les tissus à haut métabolisme s'oppose au tonus vasoconstricteur sympathique. Bien que la nature des structures sensibles à l'oxygène impliquées au niveau tissulaire ne soit pas encore complètement bien comprise, il semble que le capteur soit la cellule endothéliale. Des gaps jonctions permettent de transmettre entre les cellules endothéliales par une vague de dépolarisation/hyperpolarisation rétrograde pour terminer par le muscle lisse vasculaire.

d. Rôle des globules blancs

Les globules blancs jouent aussi un rôle dans la viscosité sanguine. Malgré leur faible nombre, leur viscosité est plusieurs milliers de fois plus élevée que celle des GR tout en ayant une déformabilité moindre. Les leucocytes créeront donc dans les vaisseaux où ils sont présents une élévation importante de la viscosité locale apparente. A l'extrême, ils peuvent par obstruction empêcher certaines branches capillaires d'être perfusées, ce d'autant si ces leucocytes sont activés et si le débit local est faible.

III. DELIVRANCE DE L'OXYGENE

1. Délivrance locale en O_2

Krogh décrit en 1919 un modèle mathématique de transport de l'oxygène basé sur une géométrie cylindrique et sur le fait que chaque capillaire devait concerner un volume tissulaire unique[34]. Maintenant notre vision des choses est un modèle où l'oxygène diffuse des artérioles et des capillaires dans n'importe quelle direction, ceci n'étant gouverné que par le gradient de PO_2 (PO_2 /dr). La distance critique de la diffusion de l'O_2 est la distance maximale entre la mitochondrie et la source d'O_2 pour que la mitochondrie fonctionne de façon correcte. Cette distance est déterminée par les paramètres de diffusion de l'O_2, par la PO_2 capillaire et la consommation tissulaire en O_2. L'adéquation de l'oxygénation tissulaire est donc déterminée par la délivrance locale en O_2, la distance critique de diffusion de l'O_2 et la distance intercapillaire.

Le globule rouge a priori détecte la PO_2 locale par une modification de conformation de l'hémoglobine et donne un signal de vasodilatation à la microcirculation (ATP, NO, nitrosothiols).

2. Adaptation du flux microcirculatoire aux besoins

a. Facteurs neurogènes

Des lacis nerveux font synapse avec les cellules musculaires lisses ou la paroi vasculaire. Le **système sympathique** notamment provoque une **vasoconstriction** dose-dépendante dautant plus forte que le vaisseau est de petit calibre au départ. D'autre part l'activation du système sympathique diminuerait l'amplitude mais augmenterait la fréquence de la vasomotion.

b. Facteurs humoraux

i. Théorie des médiateurs vasodilatateurs

Une augmentation du métabolisme cellulaire induirait la formation de substances vasodilatatrices qui diffuseraient en amont vers les artérioles. Les candidats potentiels pour être ces substances vasodilatatrices sont l'adénosine, libérée par l'ATP en condition hypoxique, mais aussi le lactate, l'histamine, la sérotonine, le CO_2, les ions K^+, les ions H^+.

ii. Théorie du besoin en O_2

L'augmentation de l'extraction en O_2 induirait une vasodilatation selon des mécansmes non élucidés.

c. Autres facteurs

iii. Facteurs myogéniques

Tout étirement de la fibre musculaire périvasculaire provoquera une contraction de celle-ci. Si la pression de perfusion augmente, cela provoque une vasoconstriction.

iv. Facteurs endothéliaux

Ils seront vus plus en détail après mais citons juste

- Vasodilatateurs : NO et EDHF (endothelium derived hyperpolarising factor)
- Vasoconstricteurs: endothéline, anion superoxyde $O_2°^-$

STRUCTURE ET FONCTIONS DES VAISSEAUX

La figure 8 montre une coupe de vaisseau, dont nous allons voir plus en détail la structure en relation avec la fonction. Ainsi nous parlerons de l'endothélium, chef d'orchestre du vaisseau et de sa paroi avec ses interactions avec les cellules endothéliales entre elles, les cellules musculaires lisses, les éléments figurés se trouvant dans la lumière du vaisseau et les facteurs de coagulation. Nous parlerons de la cellule musculaire lisse en insistant sur le phénomène de vasomotion. Enfin nous nous attarderons sur le glycocalyx, ce manteau de la cellule qui au niveau de l'endothélium n'a probablement pas encore tout révélé.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

I. L'ENDOTHELIUM

L'endothélium contribue de façon active à la **fonction cardiovasculaire**. Cette monocouche qui souligne tout le système vasculaire représente une interface entre le sang et les tissus de surfaces gigantesques : 280 m^2 pour les muscles squelettiques, 90 m^2 pour les poumons. L'endothélium pèse environ 1,5 kg pour 70 kg de poids. Il représente **la plus grande surface d'échange de l'organisme**. En **position stratégique** entre les éléments circulant du sans et la paroi vasculaire, il reçoit, intègre et envoie des signaux centrifuges et centripètes.

L'endothélium est constitué de cellules plates polygonales, de 0,2 à 0,3 µm d'épaisseur, arrangées en « pavé » et en monocouche. En plus des organites habituels, la cellule endothéliale possède à côté des organites intracellulaires classiques, les corps de Weibel-Palade (contenant le facteur VIII).

L'endothélium est une **membrane semi-perméable** qui retient le plasma à l'intérieur des vaisseaux et qui permet un passage rapide des nutriments du sang vers les tissus.

Les deux structures qui gouvernent cette perméabilité sont les jonctions intercellulaires et le manteau de l'endothélium : le **glycocalyx.**

1. ACTIONS DE L'ENDOTHELIUM SUR LE SANG

a. Catalyse de la formation d'angiotensine II

L'enzyme de conversion de l'angiotensine -une carboxypeptidase à zinc- se trouve fixée à la surface endothéliale et sert à convertir l'angiotensine I - circulante et relativement inactive- générée par les reins en angiotensine II, **puissant vasoconstricteur**.
C'est surtout la circulation pulmonaire qui va remplir cette tâche car c'est la première grande surface d'endothélium rencontrée par le flux sanguin après les reins.
Par ailleurs l'enzyme de conversion dégrade les agents vasoactifs que sont la bradykinine et la sérotonine quand ils passent par les poumons.

b. Rôle dans la coagulation, et l'inflammation

L'endothélium comprend des **propriétés anticoagulantes et profibrinolytiques** (voir la figure 9). L'endothélium est une surface physiologiquement non thrombogène qui évite le contact avec le sous-endothélium hautement thrombogène pour sa part.

Les héparane-sulfates de sa matrice extracellulaire favorisent l'activité inhibitrice de l'antithrombine III (AT III), principal inhibiteur physiologique de la coagulation par action sur la thrombine. Les cellules endothéliales expriment en plus le tissue factor pathway inhibitor (TFPI) dont le rôle est d'inhiber le facteur IXa nécessaire à l'activité catalytique du complexe facteur tissulaire / facteur VIIa. De plus, un troisième système inhibiteur est celui de la **protéine C** qui module l'action de la coagulation après la formation de thrombine. La protéine C est activée à la surface de l'endothélium par la thrombine formant un complexe avec la thrombomoduline (TM) via le récepteur endothélial de la protéine C. L'endothélium synthétise également le facteur S, cofacteur de la protéine C. Les cellules endothéliales contiennent les **corps de Weibel-Palade**, qui sont des organites de stockage en forme de bâtons composés de nombreux tubules longitudinaux à l'intérieur d'une membrane. Ces tubules sont constitués de **facteur von Willebrand** (vWF), glycoprotéine endothéliale, sécrétée de façon constitutive par l'endothélium et de **P-sélectine**, une protéine favorisant l'adhésion leucocytaire. Quand l'endothélium est activé par un agoniste proinflammatoire, la P-sélectine est transloquée vers la surface et initie la capture des leucocytes circulants.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

c. Inhibition de l'agrégation plaquettaire par le NO et les prostacyclines

Cette action antihémostatique du NO et des prostacyclines contrebalance l'effet du facteur von Willebrand.

Quand le sang coagule, les récepteurs endothéliaux activés de la thrombine causent non seulement l'exocytose du vWF, promouvant l'adhérence plaquettaire, mais aussi ils augmentent la production de NO et de prostacyclines. Ainsi les sécrétions endothéliales permettent d'activer un **processus limité et bien régulé**.

2. MODULATION DU TONUS VASCULAIRE

Le tonus vasculaire représente la tension active du muscle lisse vasculaire qui est situé dans la média des artères. Les tissus capables d'une hyperhémie (augmentation du flux) importante sont ceux qui ont un haut niveau de tonus vasculaire au repos (par exemple dans le muscle squelettique). Trois médiateurs sont synthétisés et non stockés par l'endothélium et peuvent moduler le tonus vasculaire :

- **Monoxyde d'azote (NO) (vasodilatateur)**
- **Prostacycline PGI2 (vasodilatatrice)**
- **Endothéline (vasoconstrictrice)**

a. Le NO

i. Qui est il ?

Le monoxyde d'azote est un gaz facilement diffusible, très lipophile, de courte demi-vie. Il est synthétisé à un taux faible même à l'état basal. Il a des effets multiples :

- Le NO inhibe la vasoconstriction des cellules musculaires lisses entraînant ainsi une vasodilatation. Son rôle physiologique est de moduler le tonus basal des cellules musculaires lisses. Certaines substances peuvent stimuler la synthèse de NO comme les bradykinines
- Le NO inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses
- Le NO inhibe l'agrégation plaquettaire
- Le NO est un lien dans la cascade qui cause la formation de « trous » dans l'endothélium veinulaire lors de l'inflammation
- Le NO inhibe la transcription nucléaire de molécules d'adhésion leucocytaire comme le VCAM endothélial

ii. Comment le NO provoque une vasodilatation ?

Synthétisé par les cellules endothéliales avoisinantes, il va de façon **paracrine** réagir avec le groupement héminique de la **guanylate cyclase**. Cette enzyme catalyse la formation de guanosine monophosphate cyclique cGMP. Le **cGMP** active des **kinases** qui vont phosphoryler des protéines entraînant une vasodilatation.

Par ailleurs, des concentrations élevées de NO peuvent directement activer les canaux potassium calcium-dépendants, les $\mathbf{K_{Ca}}$, hyperpolarisant la membrane des cellules musculaires lisses et entraînant une vasodilatation.

iii. Sous quelles conditions est-il synthétisé ?

- Le NO est généré à partir de la **L-arginine** et survit seulement **quelques secondes** dans les tissus car il réagit rapidement avec **l'anion superoxyde O_2^-.** Il doit donc être généré en permanence pour avoir un effet biologique. L'enzyme qui se charge de sa synthèse continue est la **eNOS**, NO synthase endothéliale ou constitutive ou NOS III, qui est enchâssée à la partie interne de la membrane endothéliale, particulièrement au niveau de **caveolae**.
- L'eNOS a une activité stimulée par :
    - **le shear stress**

C'est la stimulation probablement la plus importante en temps normal et qui explique une synthèse continue de NO. Un blocage pharmacologique de la NO synthase provoque une vasoconstriction. L'augmentation du flux dans le muscle pendant un exercice augmente le shear stress et provoque une vasodilatation flux-dépendante.

- **des agonistes**

Le complexe calcium-calmoduline augmente l'activité de l'eNOS. L'augmentation de calcium intracellulaire promeut la formation de complexe calcium-calmoduline.

Cette augmentation de calcium dans la cellule peut se faire par deux voies possibles :

- l'activation des ROC augmentant l'influx de calcium de l'extracellulaire vers le cellulaire
- la libération des stocks calciques du réticulum endoplasmique : le complexe récepteur/agoniste se lie à la phospholipase C qui catalyse la formation d'IP3 (inositol triphosphate) qui ouvre les store operated calcium channels

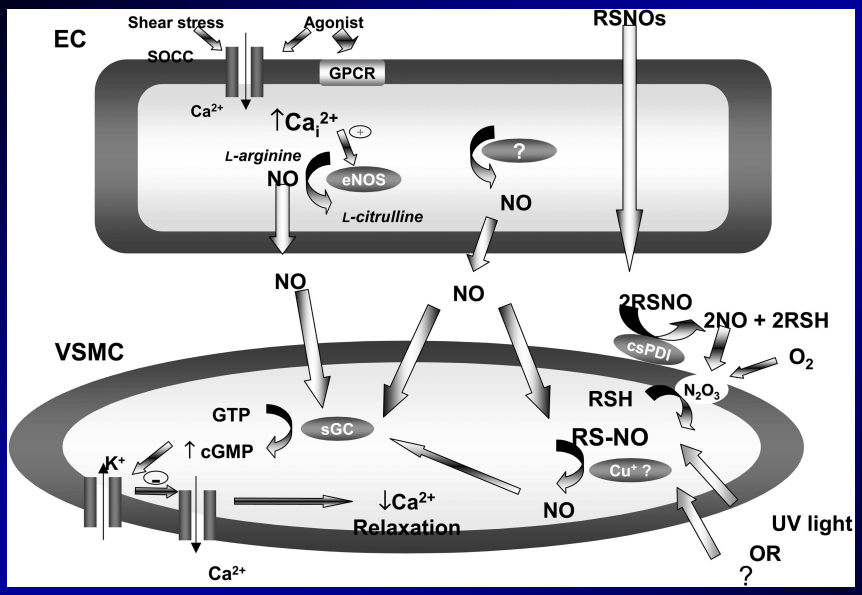


Figure 10: La voie du NO et de ses composés dérivés entre cellule endothéliale et cellule musculaire lisse d'après Triggle.

b. Pourquoi la régulation du tonus vasculaire est fondamentale ?

Le tonus vasculaire régule :

- **Le flux sanguin local**
- **La pression artérielle**
- **La filtration capillaire**
- **La pression veineuse centrale**

Le flux sanguin local tissulaire est contrôlé par le diamètre des vaisseaux de résistance : les artères terminales et les artérioles. Même un changement minime du rayon r du vaisseau va provoquer un changement de résistance important, du fait de la loi de Poiseuille faisant varier la résistance de façon proportionnelle au rayon à la puissance quatre (r^4). Au niveau de la peau, du muscle par exemple, le flux peut être multiplié par un facteur 20 pour faire face respectivement à la régulation thermique et à un exercice physique.

La pression artérielle est le produit des résistances périphériques totales par le débit cardiaque. Elle est régulée en permanence par la modulation de la résistance des vaisseaux.

Le recrutement capillaire et la pression capillaire sont régulés par le tonus artériolaire. Ainsi, le tonus artériolaire influence l'homogénéité de la perfusion tissulaire, le taux de filtration liquidienne locale et par là du volume plasmatique.

La pression veineuse centrale est affectée par la distribution du sang entre les veines périphériques et les veines centrales. La contraction des veines périphériques et des veinules déplace un volume considérable de sang dans les veines centrales, élevant les pressions de remplissage, et ainsi le volume d'éjection systolique.

II. LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE

La cellule musculaire lisse est le principal constituant de la média des artères, artérioles, veines et veinules. Cette cellule fait 20 à 60µm de long et 4µm environ de largeur en son centre. Elle se distribue autour de l'axe du vaisseau de manière hélicoïdale, pour que son tonus de contraction régule le diamètre du vaisseau. La contraction est gouvernée principalement par la concentration calcique cytosolique mais :

- Les **potentiels d'action ne sont pas nécessaires à la contraction** contrairement à la cellule musculaire cardiaque ou squelettique
- **C'est plus la myosine que l'actine qui est activée**. La myosine est activée enzymatiquement par la phosphorylation suivant l'augmentation de la concentration calcique
- **La force de la contraction est régulée par la sensibilité des fibres au calcium et par la concentration de calcium,** et les agonistes vasoconstricteurs agissent sur ces deux phénomènes
- **La contraction est permanente dans les cellules musculaires lisses (c'est le tonus basal)** alors qu'au niveau du cœur la contraction dure 300ms. La contraction musculaire lisse doit donc plus être vue comme une augmentation du tonus plutôt qu'une contraction *de novo* et la vasodilatation comme une diminution de ce tonus basal.

1. PROPRIETES CONTRACTILES DE LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE

a. Déclenchement de la contraction

La contraction peut être déclenchée par des mécanismes

- **Neuronaux :** nerfs sympathiques neuromoteurs libérant de la noradrénaline
- **Hormonaux endocrines :** adrénaline, angiotensine II, vasopressine
- **Paracrines :** endothéline (récepteurs ET_A et ET_B), sérotonine (5HT2), histamine (H1), et thromboxane

- En laboratoire, **le potassium isotonique** est souvent utilisé comme vasoconstricteur non spécifique en agissant sur le potentiel transmembranaire

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

b. La contraction est lente mais soutenue

La vitesse de contraction des cellules musculaires lisses est jusqu'à 10 fois inférieure à celle d'une cellule musculaire squelettique. Les « crossbridges » de myosine se défont plus lentement que dans le muscle strié. Par contre, la longueur importante des myofilaments permet une **fraction de raccourcissement importante** (jusqu'à plus que 50% de raccourcissement). La force de contraction est majoritairement régulée par des stimuli chimiques externes agonistes comme la noradrénaline libérée aux extrémités sympathiques nerveuses. **La durée de la contraction est soutenue**. La plupart des artérioles et des artères maintiennent effectivement pendant toute leur vie un certain degré de contraction.
Ainsi, la capacité d'augmenter le flux sanguin nécessite forcément une réduction du tonus basal par dilatation.

c. La vasomotion (automaticité) est la contraction rythmique de certains vaisseaux

A l'échelle macrocirculatoire, les artères et les veines ont généralement un tonus vasculaire stable, ainsi que leur potentiel membranaire et leur niveau de calcium, en tout cas jusqu'à ce qu'elles soient « stimulées ». Par opposition, beaucoup d'artérioles ont la propriété d'avoir des contractions rythmiques, plusieurs fois par minute, et ce de façon indépendante des stimulations extérieures. Cette **vasomotion** est due à des oscillations coordonnées du taux de calcium cytosolique. Cette coordination qui existe d'une cellule à l'autre, est probablement transmise par les gap-junctions. Au niveau des artérioles, une libération cyclique de calcium à partir des stocks de calcium du réticulum sarcoplasmique sensibles à l'inositol tri phosphate (IP3), active les canaux ioniques de surface ($i_{Cl(Ca)}$) qui cause ainsi une dépolarisation rythmique.

La pertinence physiologique de la vasomotion reste un débat actuel[35]. A priori un vaisseau avec un diamètre oscillant augmente sa conductance et donc son flux. De plus, une contraction oscillante est peut-être moins coûteuse en terme d'énergie. La prévalence de la vasomotion est moindre dans le diabète, alors que c'est l'inverse dans l'hypertension artérielle, dans les modèles animaux et chez l'homme. La vasomotion semble être bénéfique

pour l'oxygénation tissulaire dans les situations où la perfusion devient critique. Pour Intaglietta[36], les périodes de flux élevé avec basse fréquence, comme c'est le typiquement le cas au niveau des artérioles proximales homogénéisent la distribution de l'O_2 aux tissus.

I. REGULATION DU TONUS VASCULAIRE

1. Facteurs intrinsèques

Cette régulation intrinsèque est responsable de l'autorégulation du flux, de l'hyperhémie réactionelle, du vasospasme

- Réponse myogénique à l'étirement
- Substances vasoactives endothéliales
- Métabolites actifs synthétisés par les tissus (adénosine…)
- Autacoïdes
- Température

2. Facteurs extrinsèques

- Nerfs vasomoteurs
- Hormones circulantes : adrénaline, angiotensine, vasopressine, insuline

III. LE GLYCOCALYX

Décrit en 1963 par Bennett, le glycocalyx est une structure anionique polymérique. Ses constituants comprennent la podocalyxine (une sialoglycoprotéine), l'héparane sulfate, et l'acide hyaluronique.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

Le glycocalyx est un manteau chargé négativement visualisé en microscopie électronique il y a 40 ans par Luft[37] grâce au rouge ruthénium.

Son épaisseur varie en fonction notamment du diamètre du vaisseau considéré :

- 0,5 µm pour les capillaires musculaires[38]
- 2-3 µm pour les petites artères[39]
- 4,5 µm pour les carotides[40]

Il faut se le représenter comme un **réseau en maille** dans lequel les molécules solubles issues du plasma d'une part, et de l'endothélium d'autre part s'incorporent en permanence.
Le flux sanguin affecte en permanence la composition et l'épaisseur du glycocalyx.
Il existe par ailleurs un équilibre dynamique entre sa biosynthèse et sa dégradation[41]. Sa dégradation dépend de phénomènes enzymatiques d'une part, et du shear stress d'autre part.

1. COMPOSITION DU GLYCOCALIX[42]

a. Protéoglycanes

Il est composé de protéoglycanes qui constituent sa « colonne vertébrale » composée de protéine core et d'une association variable de glycosaminoglycanes variant selon les circonstances et les stimuli[43]. Les glycosaminoglycanes sont au nombre de 5 :

- Héparane sulfate
- Chondroitine sulfate
- Dermatane sulfate
- Kératane sulfate
- Hyaluronane =Acide Hyaluronique

Ce sont des polymères linéaires de disaccharides modifiés par sulfation et (de)acétylation.
L'héparane sulfate représente 50-90% de la quantité de protéoglycannes présent dans le glycocalix[44;45].Le ratio heparane sulfate / chondroitine sulfate est typiquement de 4 :1 au niveau de l'endothélium vasculaire[46;47].
L'acide hyaluronique est une longue molécule polymérique (jusqu'à 10^4 kDa). Par rapport aux autres glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique n'est pas lié à une protéine core, alors que son lien exact avec la membrane est mal connu. Il peut par exemple être attaché via le CD44[48], ou par ses protéines de synthèses, les synthases d'acide hyaluronique[49] situées sur le versant cytosolique de la membrane. Une autre possibilité est que l'acide hyaluronique soit en partie non attaché. Contrairement à ses « collègues », l'acide hyaluronique, synthétisé donc à

la surface interne de la membrane plasmique, ne peut pas subir de modifications post-traductionnelles. Par ailleurs, des protéines fixant l'acide hyaluronique existent dans le cytosol et pourraient faire évoquer un rôle intracellulaire inconnu de l'acide hyaluronique[50;51].

b. Glycoprotéines

Elles représentent une autre épine dorsale en faisant la connexion entre le glycocalyx et la membrane endothéliale. Ce sont des chaînes de 2 à 15 résidus osidiques. Les trois familles de molécules d'adhésion cellulaire présentes dans le glycocalyx sont les **sélectines, les intégrines et les immunoglobulines**.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

Les sélectines retrouvées au niveau de l'endothélium sont les E-sélectines et les P-sélectines, toutes deux impliquées dans les interactions leucocyte / cellule endothéliale[52].

Les P-sélectines sont contenues dans les **corps de Weibel-Palade**. Une exocytose rapide de ces corps de Weibel-Palade permet la translocation de P-sélectine induite par des stimuli comme la thrombine ou l'histamine[53;54]. Un processus d'internalisation rapide également explique une demi-vie d'activité courte. La E-sélectine, par opposition n'est pas stockée dans des granules et nécessite quelques heures (2-6h) puisque nécessitant une synthèse protéique de novo à partir d'ARN. Des médiateurs comme le TNF-α, l'Il1-β, et le LPS augmentent l'expression de E-sélectine à la surface endothéliale[55].

Les **intégrines** sont des molécules hétérodimériques avec domaine cytoplasmique et domaine transmembranaire. Chaque intégrine est caractérisée par une association différente de sous-unité alpha et béta[56]. Les intégrines sont retrouvées au niveau des cellules endothéliales, des leucocytes et des plaquettes. Ces intégrines peuvent par ailleurs avoir des interactions avec la laminine, la fibronectine et le collagène.

La superfamille des **immunoglobulines** comprend les molécules d'adhésion intercellulaire 1 et 2 (ICAM-1 et ICAM-2), la molécule d'adhésion vasculaire cellulaire 1 (VCAM-1) et la molécule cellulaire d'adhésion endothéliale/plaquette (PECAM-1).

Ces immunoglobulines servent de ligands aux intégrines situées sur les leucocytes et les plaquettes servant donc à l'adressage de ces éléments figurés vers l'endothélium avec la séquence rolling, adhésion, diapédèse. ICAM-1, ICAM-2 et PECAM-1 ont une expression

basale alors que VCAM-1 est seulement présente après stimulation cellulaire par les cytokines qui de plus surrégule l'expression d'ICAM-1[57].

En plus d'abriter ces molécules d'adhésion cellulaire, le glycocalyx abrite des **glycoprotéines impliquées dans la coagulation, la fibrinolyse et l'hémostase**. Pour exemple, le complexe glycoprotéique Ib-IX-V est exprimé sur les cellules endothéliales et les plaquettes. Ce complexe se lie au facteur von Willebrand (vWf) et était connu initialement comme le récepteur plaquettaire au vWF[58;59]. De plus ce complexe se fixe aussi aux P-sélectines, servant l'interaction plaquettes/cellules endothéliales activées[60]. Tout comme les plaquettes, les cellules endothéliales expriment tous les composants de ce complexe Ib-IX-V qui d'un côté fixe le substrat du vWF au sous-endothélium, et de l'autre le vWF issu des corps de Weibel-Palade sécrété dans la lumière par les cellules endothéliales activées.

c. Les composant solubles

Les composés solubles se trouvant enchâssés dans les mailles du glycocalyx dérivent soit de l'endothélium, soit du courant sanguin. Parmi ces composés, l'**albumine** et **l'orosomucoïde** par exemple contribuent à la sélectivité de la barrière de perméabilité en apportant des charges négatives[61].

2. FONCTIONS DU GLYCOCALYX

a. Rôle dans la perméabilité vasculaire

A l'interface entre le flux sanguin et l'endothélium, le glycocalyx est un déterminant primordial de la perméabilité vasculaire. Il peut limiter l'accès de certaines molécules grâce à des propriétés de barrière stérique, de taille et de charges ioniques. Ces charges ioniques négatives sont apportées par les résidus sulfates, nombreux sur les glycosaminoglycanes. En effet, si on neutralise le glycocalyx, la captation de l'albumine par des cellules endothéliales en culture augmente[62]. La loi de Starling sur les échanges capillaires a du être revisitée depuis la découverte du glycocalyx.

b. Rôle dans les interactions éléments figurés / endothélium

Le glycocalyx repousse les globules rouges de façon centripète. Ceci est observable *in vivo* en observant **une zone d'exclusion des globules rouges** qui flanque l'endothélium et qui disparaît si on perturbe le glycocalyx[63]. **Les plaquettes sont aussi « rejetées »** par l'endothélium, mais si on dégrade le glycocalyx par des LDL oxydés, on augmente ces interactions entre plaquette et endothélium[64]. Les **interactions avec les leucocytes sont plus nuancées** : d'un côté, le glycocalyx arbore les molécules d'adhésion P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1, de l'autre côté, il diminue l'adhésion des leucocytes à ces molécules. Dans les conditions normales, il semble que le glycocalyx dissimule les molécules d'adhésion leucocytaire. Quand des stimuli appropriés dégradent le glycocalyx ou du moins desserrent ses mailles, comme des enzymes, cytokines, l'ischémie-reperfusion, les molécules d'adhésion sont découvertes ce qui permet l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium[65;66].

c. Rôle dans la rhéologie

La présence *in vivo* d'une couche relativement épaisse de glycocalyx dans la lumière vasculaire a des conséquences évidentes pour la rhéologie, tout particulièrement dans la microcirculation[67;68]. En effet dans la microcirculation, il semble que la **viscosité locale et l'hématocrite** soient modulés par le glycocalyx[69]. Des agonistes vasodilatateurs comme l'adénosine peuvent recruter du volume capillaire en augmentant l'accessibilité au glycocalyx du plasma sans forcément changer l'accessibilité aux globules rouges. Dans des conditions contrôles, une épaisse couche de glycocalyx souligne l'endothélium des capillaires et induit une baisse de l'hématocrite dans le capillaire. En ajoutant de l'adénosine, l'accessibilité du plasma au glycocalyx augmente, résultant en une augmentation de l'hématocrite et du volume de capillaire perfusé. Dans ce concept, la modulation du volume exclu de sang par le glycocalyx pourrait révéler un mécanisme par lequel les substances vasoactives pourraient augmenter le volume de capillaires perfusés fonctionnellement et la surface d'échanges, en plus du phénomène de vasodilatation des vaisseaux de résistance.

d. Rôle de mécanotransduction

Les éléments exacts responsables de la translation de signaux biomécaniques (forces de frottement, shear stress) en signaux biochimiques (synthèse de NO) sont encore inconnus. Cependant le glycocalyx est un candidat de choix pour expliquer ce phénomène. Un traitement par héparitinase[70] (héparane sulfate) ou par hyaluronidase[71] (acide hyaluronique) diminue la **production de NO flux dépendante**. Un rétrocontrôle positif semble exister puisque l'exposition de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) à un shear stress double l'incorporation d'acide hyaluronique dans le glycocalyx[72].

e. Rôle dans la protection vasculaire et d'orchestration de son environnement

La dégradation du glycocalyx par traitement enzymatique augmente l'adhésion des leucocytes au niveau veinulaire[73], provoque un œdème périvasculaire[74], et altère la production de **NO flux-dépendante** dans les artères[75] et dans des cellules endothéliales en culture[76].

Cette dégradation du glycocalyx peut être déclenchée par des facteurs proinflammatoires comme le **TNF-α**[77] et des stimuli athéromateux, l'ischémie-reperfusion[78] par le biais des ROS, et la perfusion de lipoprotéines oxydées de faible densité[79;80].

Le tableau I montre les molécules que le glycocalyx permet de faire fonctionner correctement.

La capacité antioxydante de la **SOD extracellulaire** en réduisant le nombre de molécules d'anion superoxyde, permet dans le même temps d'augmenter la biodisponibilité du NO qui aurait pu réagir avec O_2°- pour donner du péroxynitrite lui aussi pro-oxydant.

De nombreux **anticoagulants** importants peuvent se fixer au glycocalyx, comme l'antithrombine III qui se fixe à l'héparane sulfate[81], le cofacteur 2 de l'héparine activé par le dermatane sulfate[82], la thrombomoduline, et le TFPI inhibiteur du facteur tissulaire. La thrombomoduline est une protéine contenant du chondroitine sulfate capable de convertir la thrombine d'une enzyme procoagulante à un activateur de la **voie de la protéine C**[83].

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

3. LE GLYCOCALYX EN PHYSIOPATHOLOGIE

a. Le diabète

Une des caractéristiques du diabète est une absence ou une résistance à l'insuline, diminuant les capacités de protection de l'endothélium[84], augmentant la perméabilité capillaire[85], et un mauvais fonctionnement de la NO synthase[86]. Chez des volontaires sains, 6 heures après l'induction d'une hyperglycémie aigue, le volume du glycocalyx est divisé par deux[87]. La technique utilisée consiste à comparer le volume de distribution d'un traceur perméable et imperméable au glycocalyx. Dans une étude très élégante Nieuwdorp et collaborateurs[88] montrent que chez les patients ayant un diabète de type 1 le volume du glycocalyx est diminué de moitié voire plus chez les patients ayant une microalbuminurie et que les taux d'acide hyaluronique circulants étaient augmentés, témoignant probablement d'une synthèse et/ou d'une dégradation rapide du glycocalyx.

b. Autres pathologies

L'ischémie-reperfusion intestinale réduit l'épaisseur du glycocalyx dans les veinules mésentériques de rat[89]. Ces effets sur le glycocalyx peuvent être prévenus en bloquant la xanthine-oxydoréductase, enzyme endogène produisant des ROS et qui se fixe aux domaines d'héparane sulfate du glycocalyx[90]. L'injection d'acide hyaluronique exogène, ou l'administration de toxine botulinique (qui inhibe la perte de GAG par les protéines G) diminue les dommages liés à l'ischémie-reperfusion[91]. Toutes ces données suggèrent un rôle important de l'altération du glycocalyx dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion.
L'athéromatose est une autre pathologie, où l'implication des ROS est importante aussi et où le glycocalyx semble dysfonctionner[92].

4. VISUALISATION DU GLYCOCALYX

Un des écueils de la visualisation directe du glycocalyx est sa **fragilité importante**, notamment lors de manipulations des vaisseaux, ou si ceux-ci sont déshydratés. Des protocoles de plus en plus sophistiqués sont utilisés pour visualiser le glycocalyx en microscopie électronique qui sous-estiment de moins en moins son épaisseur[93-95]. L'équipe de Vink utilise pour la première fois en 1996 des **mesures indirectes en microscopie intravitale** dans des capillaires de muscle crémaster de hamster[96]. Cette méthode indirecte consiste à mesurer le diamètre anatomique du vaisseau et d'en soustraire l'épaisseur de la colonne de plasma marquée par du dextran fluorescent. Cette méthode a été utilisée à de nombreuses reprises depuis chez le hamster[97-99] et la souris[100;101]. L'autre méthode utilisée en imagerie par microscopie orthogonale par polarisation spectrale (OPS) en sublingual consiste à estimer l'épaisseur du glycocalyx entre la colonne de globules rouges à l'état basal (diamètre fonctionnel) et la colonne après passage de leucocytes (diamètre anatomique)[102].

Des approches de visualisation directe du glycocalyx ont été faites avec des marquages par des lectines qui vont se fixer aux parties disaccharidiques des glycosaminoglycanes[103;104], ou des anticorps dirigés contre l'héparane sulfate, le syndecan-1 ou l'acide hyaluronique[105;106]. Ces marqueurs sont attachés à d'autres marqueurs fluorescents.

Une technique prometteuse est le TPLSM microscopie avec laser scanner biphotonique permettant une visualisation du glycocalyx dans des vaisseaux plus larges qu'avec les autres techniques[40;107].

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

ALTERATIONS CARDIOCIRCULATOIRES DANS LE SEPSIS

I. LA POMPE

1. Mécanismes supracellulaires

a. Substances cardiodépressives

Les principaux médiateurs qui peuvent être responsables d'une dysfonction contractile sont les **cytokines proinflammatoires**, le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6[108]. Les mécanismes proposés de la dysfonction myocardique liée au TNF-α sont l'activation de la sphingomyélinase neutre, la suppression des transitoires calciques et la voie du NO. Le TNF-α peut également activer des protéases intracellulaires. Par exemple, le TNF-α peut induire l'activation des calpaïnes, des caspases et pourrait participer à la dégradation des protéines contractiles elles-mêmes comme les troponines. Après stimulation par le calcium, les calpaïnes peuvent cliver la troponine I.

Les caspases peuvent quant à elles, cliver l'α-actine, l'α-actinine et la troponine T[109].

Le TNF-α peut également jouer sur le métabolisme de l'acide arachidonique, des protéines kinases, des ROS, du NO, la transcription d'une variété de gènes cytotoxiques, l'ADP-ribosylation et potentiellement la fragmentation nucléaire.

b. Leucocytes et ROS

Le radical superoxyde, $O_2^{\circ -}$ et ses dérivés, issus pour une partie importante des leucocytes sont supposés être une cause importante d'altérations de la fonction cardiaque[110]. Les ROS provenant de la mitochondrie sont une autre source possible dans le cœur et elles possèdent de nombreuses cibles[111]. Des niveaux élevés de ROS peuvent en effet altérer les protéines et leur fonctionnement, les membranes cellulaires et les acides nucléiques.

c. Anomalies de perfusion

Typiquement, une ischémie globale n'a pas été retenue comme facteur explicatif proéminent dans la dysfonction myocardique lors du sepsis chez l'homme. Cependant les données expérimentales peuvent suggérer qu'une dysfonction microvasculaire est envisageable dans le cœur également[112-114], avec une dysfonction endothéliale, des shunts microcirculatoires, des « pluggings » de leucocytes dans les capillaires et de l'oedème interstitiel. Des zones d'unités microcirculatoires fragiles ont été retrouvées dans le cœur par fluorescence de NADH et par imagerie par émission de positrons[115] dans des modèles animaux.

2. Mécanismes cellulaires

a. Down-régulation des récepteurs β-adrénergiques

La réponse aux β-stimulants dans les modèles LPS est biphasique avec une augmentation de la réponse pendant 12 heures, puis une diminution après 36 heures. Ceci suggère des modifications de la voie de l'adénylate cyclase avec une augmentation de son

activité dans un premier temps, puis une diminution dans un deuxième temps à cause de l'internalisation des récepteurs d'une part, et par l'augmentation de la sous-unité Giα (inhibiteur de l'adénylate cyclase) d'autre part[116]. Cette diminution de l'effet de la stimulation β a aussi été décrite chez l'homme[117].

b. Calcium et myofilaments

Des anomalies du transitoire calcique et des altérations de la sensibilité des fibres au calcium sont possibles.

La diminution de la sensibilité des fibres au calcium est dose-dépendante et réversible dans le temps[118]. Même si les mécanismes exacts de cette désensibilisation ne sont pas complètement élucidés, des phosphorylations des filaments semblent intervenir, de la troponine I notamment[119-121], et pourquoi pas suite à l'activation de kinases GMPc-dépendantes par le NO. Cette diminution de la sensibilité des fibres au calcium qui s'accompagne d'une augmentation de la longueur et de la distensibilité ventriculaire[122] pourrait au moins en partie expliquer la dilatation ventriculaire gauche retrouvée lors du sepsis.

L'efficacité du lévosimendan a restaurer la fonction cardiaque chez l'animal[123;124] comme chez l'homme[125] plaide pour cette théorie de la désensibilisation des fibres au calcium.

c. Voie du NO et du péroxynitrite

L'incubation de LPS sur des cardiomyocytes *in vitro* leur fait sur-exprimer l'iNOS. Cependant, le NO semble avoir un **rôle indirect**[126] dans cette cardiodépression puisque chez l'animal comme chez l'homme, l'inhibition des NOS élève la pression artérielle mais elle baisse le débit cardiaque.

Le NO par contre en se combinant avec l'anion superoxyde va donner naissance au **péroxynitrite**. Ce dernier, en dénaturant des protéines, en modifiant les flux calciques[127], en inhibant la respiration mitochondriale[128] peut induire une dysfonction myocardique lors du sepsis[129].

d. Apoptose cardiaque

Malgré un taux extrêmement faible d'apoptose nucléaire, une activation des caspases, a été impliquée dans des modifications des sarcomères et dans une dysfonction contractile[130].

L'activation des caspases participe à la régulation de la contractilité cardiaque, à la diminution de la production des cytokines et son inhibition peut réverser cette dysfonction. De nombreux sites de clivage au niveau des protéines contractiles et structurelles sont possibles au vu des motifs possibles de clivage des caspases. La caspase 3 activée clive l'α-actine, l' α-actinine, la troponine T et la chaîne légère de myosine[131].

II. LES ANOMALIES HEMODYNAMIQUES REGIONALES LORS DU SEPSIS

La vasodilatation retrouvée dans le sepsis peut se traduire par une baisse des résistances vasculaires périphériques jusqu'à 25% de leur valeur normale, responsable d'une chute de la pression artérielle. **Cette baisse des résistances n'est pas uniforme**, rendant l'analyse d'un chiffre isolé de résistances vasculaires globales donné par un cathétérisme cardiaque droit probablement futile. Par exemple, le débit sanguin dans le muscle cardiaque[132;133] pour un travail donné ou dans le muscle squelettique augmente alors que le débit diminue au niveau rénal et dans la région hépatosplanchnique.

1. La circulation coronaire

La réponse globale de la circulation coronaire lors du sepsis est une vasodilatation. Cette réponse est peut-être reliée à **l'augmentation de l'iNOS dans le muscle lisse vasculaire**, mais d'autres facteurs comme la bradykinine peuvent être impliqués[134-136].

Dans un modèle de choc endotoxinique canin[137], la perfusion coronaire est hétérogène mais spatialement redistribuée à un niveau de perfusion globale et à un niveau de travail donné, suggérant des augmentations de perfusion dans certains territoires au dépends de diminutions dans d'autres. **Les effets des catécholamines sont modifiés** : les effets α-1 et β-2 semblent diminués, alors que l'effet α-2 semble augmenté dans le lit coronaire[138;139].

La vasodilatation endothélium-dépendante coronaire est souvent diminuée (production de NO par la eNOS) que ce soit *in vivo* ou *in vitro* mais certains auteurs retrouvent une vasodilatation endothélium-dépendante intacte[140-143].

Des réponses en vasoconstriction peuvent se voir également, médiées dans ce cas par le thromboxane A2 ou l'endothéline[144], qui sont moindres si le substrat des NOS, la L-arginine, est apportée de façon exogène[145]. Finalement il se peut que le NO dérivé de l'iNOS et produit en grande quantité sans régulation **désensibilise la guanylate cyclase aux donneurs de NO** et contribue à une tendance à la vasoconstriction malgré l'induction de l'iNOS[146].

Chez l'homme, le débit sanguin coronaire augmente également et deux études semblent exclure l'ischémie myocardique (en tout cas globale) dans les mécanismes de la dysfonction ventriculaire du sepsis[147;148]. Cependant, l'existence de shunt ou d'unités microcirculatoires faibles[149] (voir plus loin dans le texte) expliquerait qu'une dysoxie puisse exister dans certains territoires.

2. La circulation mésentérique

Que ce soit dans des modèles hypokinétiques ou dans des modèles hyperkinétiques **le flux sanguin mésentérique est diminué.** Il semble que **l'augmentation du tonus sympathique** et **l'activation du système rénine-angiotensine** soient responsables de cette vasoconstriction plus que l'endothéline[150-152].

Là aussi, la voie du NO peut être impliquée : une exposition suffisamment longue à l'endotoxine sous-régule l'eNOS alors qu'elle sur-régule l'iNOS[153-155], pouvant ainsi diminuer la réponse en vasodilatation endothélium-dépendante. Néanmoins, l'inhibition de la synthèse de NO peut avoir des effets inverses suivant les études et les espèces animales étudiées[156;157].

Par ailleurs une étude de microscopie intravitale a montré récemment chez la souris que l'application systémique ou topique d'endotoxine entraînait une vasodilatation NO-dépendante associée à une diminution de perméabilité intestinale[158].

3. La circulation hépatique

Le débit sanguin hépatique est relativement bien préservé voire augmenté dans certains modèles animaux, mais diminué dans d'autres[159;160]. Les résistances au flux au niveau

de l'artère hépatique et du tronc porte semblent être dues essentiellement au NO et à l'endothéline. Le NO au niveau hépatique peut inhiber les interactions leucocyte/endothélium comme cela a été montré sous vidéomicroscopie *in vivo* chez la souris[161] et donc peut-être avoir des conséquences bénéfiques, mais d'un autre côté altérer la fonction hépatocellulaire à cause des médiateurs proinflammatoires produit par les cellules de Kupffer.

4. La circulation rénale

Le débit sanguin rénal est généralement diminué dans les modèles animaux, même si certains modèles avec normotension[162] peuvent retrouver un débit sanguin rénal normal ou même augmenté lors du sepsis. La nécrose tubulaire aiguë du choc septique semble résulter d'épisodes intermittents d'hypoperfusion et/ou de vasoconstriction rénale sélective[163;164].

Contrairement à la circulation mésentérique, chez le rat, l'endotoxine provoque une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante et une production de NO 2 heures seulement après exposition, donc sans passer par la synthèse de NO par l'iNOS[165].

Après une longue exposition à l'endotoxine la vasodilatation endothélium-dépendante est diminuée sans altérer la réponse vasoconstrictrice[166].

5. La circulation cérébrale

Dans les modèles expérimentaux, le débit sanguin cérébral est habituellement maintenu même dans les modèles hypokinétiques. *In vitro*, la vasoconstriction des carotides de lapin est inhibée par une voie l'hypertension/NO dépendante. Un prétraitement par endotoxine chez la souris sur-régule l'iNOS dans les artères carotides et diminue la réponse vasoconstrictrice des prostanoides.

6. La circulation musculaire squelettique

Le muscle crémaster de rat a été beaucoup étudié en vidéomicroscopie lors du sepsis. Il existe une vasoconstriction des larges artérioles, une vasodilatation et une diminution de l'action vasoconstrictrice de la norepinéphrine ou de l'endothéline des petites artérioles.

La vasodilatation endothélium-dépendante pourrait augmenter dans les premiers stades du sepsis puis diminuer ensuite.

III. VOIES RESPONSABLES DES ANOMALIES DU TONUS VASCULAIRE

La réponse aux agents vasoconstricteurs adrénergiques utilisés dans le contexte du choc septique devient de moins en moins forte chez les patients septiques au fur et à mesure de l'évolution de leur pathologie[167].

La réponse vasoconstrictrice récepteur-dépendante et récepteur-indépendante est altérée ainsi que la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante et endothélium-indépendante[168-173]. La perte de la vasodilatation peut être en partie expliquée par la sécrétion de médiateurs vasoconstricteurs comme l'endothéline sécrétée à partir des cellules endothéliales qui agit principalement au niveau des circulations pulmonaires, hépatiques et rénales et par l'activation adréno-sympathique. Par ailleurs, l'état « vasoplégique » du sepsis pourrait en partie être du aux cytokines comme le TNF-alpha ou à l'iNOS. Des études animales *in vitro* et *in vivo* ont montré une augmentation de l'expression de l'iNOS différentes suivant les différents tissus étudiés, mais les anomalies de la redistribution du flux ne sont pas parallèles à celle de l'expression de l'iNOS.

Chez l'homme, les taux de nitrates/nitrites circulants sont élevés, et les taux sont corrélés avec la baisse des résistances vasculaires systémiques et le taux d'extraction de l'oxygène. Néanmoins, le ratio entre les taux élevés d'endothéline vasoconstrictrice et des taux de nitrates/nitrites vasodilatateurs[174] est encore mieux corrélé avec les résistances vasculaires systémiques et l'extraction de l'oxygène qu'aucun autre facteur isolé.

Du sérum de patients septiques dilate des vaisseaux normaux de rats[175]. Stoclet démontre que l'iNOS est surexprimée dans les artères omentales étudiées lors de laparotomie de patients septiques[176]. La diminution de la réponse vasoconstrictrice est dans cette étude partiellement NO-dépendante et partiellement prostaglandine-dépendante. Le déficit en vasopressine peut

contribuer aussi à l'état de « vasoplégie » et la réponse pressive peut être améliorée après traitement par la vasopressine[177].

1. Voie du NO

Les distinctions majeures entre le système eNOS et iNOS pourrait être résumées par

- eNOS: synthèse limitée de NO avec rétrocontrôle négatif
- iNOS: synthèse massive de NO sans rétrocontrôle négatif

Il est bien entendu tentant de rapprocher la vasodilatation intense trouvée lors du choc septique avec cette synthèse excessive de NO. Est-ce réaliste ?

Une autre caractéristique du choc septique sur laquelle nous reviendrons est la présence d'indicateurs de perfusion tissulaire inadéquate (acidose lactique…) qui pourrait être expliqué par les effets du NO sur la chaîne respiratoire mitochondriale[178]. Une étude humaine avec biopsies musculaires a montré récemment une corrélation entre une réduction de la fonction mitochondriale, des taux plasmatiques de dérivés du NO et les besoins en vasopresseurs[179]. L'excès de NO pourrait aussi être délétère sur la fonction myocardique comme nous l'avons vu. Même si elle est séduisante, cette théorie ne peut être suffisante en soi pour être pleinement satisfaisante. De nombreuses cellules animales (spécialement chez les rongeurs) peuvent sécrétées des taux extrêmement élevés de NO par la voie de l'iNOS suite à des stimuli appropriés. Ainsi les dérivés du NO (nitrates/nitrites) peuvent augmenter jusqu'à 20 fois. Chez les patients en choc septique, cette augmentation est plus de l'ordre de 2-3 fois la normale. Par ailleurs, il n'y a toujours pas à ce jour de preuve de l'expression de l'iNOS dans les tissus vasculaires des patients en sepsis. Même dans les modèles animaux, il existe des arguments pour dire que les modifications hémodynamiques ne sont pas toutes reliées à l'iNOS : les souris transgéniques knocked-out (KO) pour l'iNOS n'augmentent pas leur production de nitrates/nitrites mais les effets hémodynamiques sont seulement partiellement corrigés et la mortalité est inchangée[180;181].

L'hypotension artérielle du choc septique a été réversée dans des modèles animaux et chez l'homme avec inhibiteurs des NO synthases non spécifiques, mais certains modèles animaux et une étude de phase III chez l'homme[182] ont montré une aggravation du pronostic vital.

Le fait est que cette inhibition n'est pas spécifique de l'iNOS et qu'on bloque aussi la synthèse de NO par l'eNOS, ce qui pourrait expliquer un excès de vasoconstriction (un des arguments en faveur de cette hypothèse est que l'excès de mortalité vue dans l'étude chez l'homme apparaît être due à des défaillances cardiaques). Un autre mécanisme d'aggravation liée à l'inhibition de l'eNOS est l'aggravation de la vasodilatation flux-dépendante dans la microcirculation.

2. Voie du monoxyde de carbone (CO)

Le CO endogène peut être produit par l'hème oxygénase de type 1 (HO-1) qui est la forme inductible qu'on pourrait comparer à l'iNOS et qui peut elle aussi être stimulée par les cytokines ou les médiateurs inflammatoires rencontrés dans le sepsis.

La production supranormale de CO provoquée par l'induction de l'HO-1 peut être détectée dans l'air exhalé (méthode du condensat) chez les patients de réanimation. La production de CO augmente lors du sepsis pulmonaire. Une étude a comparé chez des patients en état de choc septique, les taux d'ARNm de l'eNOS, de l'iNOS et de l'HO-1 dans les leucocytes mononucléés et dans des cellules musculaires lisses artérielles mésentériques prélevées lors de laparotomie pour péritonite pour le groupe septique et pour carcinome dans le groupe « contrôle »[183]. Cette étude rapporte de façon intéressante que les NOS sont sous-régulées alors que l'HO-1 est sur-régulée, ce qui pourrait être une piste intéressante. Dire si cette augmentation est délétère est une autre question puisque le CO peut avoir des effets bénéfiques comme on le verra un peu plus loin dans le sepsis.

Le CO peut être vasodilatateur par plusieurs mécanismes

a) Il active la guanylate cyclase au même titre que le NO pour produire du GMPc, entraînant une vasodilatation. Il faut cependant souligner le fait que le CO, parce qu'il ne se fixe pas de la même manière sur la guanylate cyclase, ne l'active que 100 fois moins que le NO. Cette notion a été retrouvé dans un modèle de surexpression de l'hème-oxygénase-1 par des cellules musculaires lisses[184]. Dans un de nos travaux, nous avons retrouvé également une vasoconstriction liée à l'exposition au CO, probablement lié à une baisse du NO bioactif[185].

b) il peut activer directement les canaux potassiques calcium-dépendants (canaux K_{Ca})

Dans les modèles expérimentaux, le monoxyde de carbone a des effets bénéfiques respiratoires chez le cochon [186] et dans un modèle de LPS l'hémine, un inducteur d'hème-oxygénase a des effets bénéfiques sur la respiration mitochondriale au niveau du myocarde, du diaphragme, diminue les taux de dérivés du NO plasmatiques, et diminue les marqueurs de lésions tissulaires par le stress oxydatif (peroxydation lipidique et protéines carbonylées)[187]. Le CO peut aussi par exemple moduler l'adhésion leucocytaire microvasculaire[188].
La seule étude humaine concerne le modèle d'endotoxémie chez le volontaire sain où les résultats sont décevants : l'inhalation de 250 ppm de CO n'a pas d'effet bénéfique dans ce modèle[189].

3. Voie de la vasopressine

En temps normal, la vasopressine est sécrétée par les axones terminaux des neurones gigantocellulaires de l'hypothalamus et provoque une vasoconstriction par le biais des récepteurs V1 du muscle lisse vasculaire et une antidiurèse par le biais des récepteurs V2 au niveau du tube collecteur rénal.

A la phase initiale du sepsis, les taux plasmatiques augmentent d'un facteur 10 à la fois chez l'homme[190] et dans les modèles animaux[191-193]. Au-delà de 24 heures cependant, les taux redescendent à des taux normaux[194;195]. Dans les modèles endotoxiniques, le blocage des récepteurs V1R aggrave l'hypotension artérielle[196] et la survie est moindre chez des rats déficients en vasopressine[197]. Ce profil d'évolution n'est probablement pas compatible avec une responsabilité de la vasopressine pour la vasoplégie et le choc distributif du choc septique au moins à la phase initiale.
Lors du sepsis, on a retrouvé des taux de vasopressine circulante très abaissés, et même si des études randomisées manquent la perfusion de vasopressine semble chez le patient en état de choc septique baisser les besoins en catécholamines exogènes. D'une part, ce n'est pas parce que la perfusion d'un médiateur vasoconstricteur connu corrige l'hypotension que cela en prouve la responsabilité dans la physiopathologie du choc septique. De plus, les taux de vasopressine ne s'abaissent qu'après une phase initiale où il y a déjà une « vasoplégie ». D'autre part, des ischémies des extrémités et de l'intestin sont survenues chez des patients en cours de traitement.

4. Voie de l'endothéline

Le système de l'endothéline n'a été découvert qu'en 1988. La baisse de son activité a été très vite recherchée dans des modèles animaux et chez l'homme dans le contexte de choc septique avec une déception immédiate car ses taux sont élevés dans le contexte du choc septique. A fortiori, les taux d'endothéline étaient corrélés à la gravité du sepsis en général, de la dysfonction cardiaque et rénale également. Le mécanisme de surproduction de l'endothéline semble être expliqué par une atteinte endothéliale par les leucocytes activés d'une part et par la perfusion de catécholamines d'autre part. Cette hypersécrétion pourrait peut-être expliquer en partie l'hétérogénéité des effets vasodilatateurs du sepsis dans les différents tissus.

Le Bosentan, inhibiteur de l'endothéline, a montré une certaine efficacité dans le maintien d'une perfusion splanchnique adéquate lors de modèles de sepsis chez l'animal.

5. Métabolites de l'acide arachidonique

Les prostaglandines, les leukotriènes, les thromboxanes augmentent dans le plasma des patients septiques. Suivant leurs spécificités, on retrouve dans leurs propriétés : vasodilatation, activation leucocytaire, dégradation de l'endothélium.

- **Prostaglandines :**

Elles ont été découvertes dans les années 1930 par Goldblatt[198] et Von Euler dans des glandes séminales humaines accessoires d'où provienne leur nom. Différents sous-types D, E, F, G, H, et I. La plupart sont des métabolites intermédiaires instables de l'acide arachidonique[199]. La **PGI2 ou prostacycline**, est synthétisée à partir d'acides gras polyinsaturés et est le principal métabolite final de la voie de l'acide arachidonique dans le tissu vasculaire et la PGI2 synthétase a été détectée dans tous le tissus chez les mammifères et semble donc ubiquitaire. La prostacycline est hydrolysée en 6-oxo-PGF1α et excrétée par le rein. Sa demi-vie est courte (3-5 minutes).

- Inhibition de l'agrégation plaquettaire

La PGI2 augmente l'AMPc intracellulaire dans les plaquettes en activant l'adenylate cyclase qui induit une inhibition réversible de l'agrégation plaquettaire et qui en parallèle, via l'AMPc inhibe la phospholipase et la cyclooxygénase plaquettaire. Il semblerait que la PGI2 inhibe l'agrégation plaquettaire par une voie AMPc-indépendante également.

- Inhibition de l'interaction plaquette/leucocyte

en réduisant l'expression du récepteur du fibrinogène GIIb/IIIa et de la P-sélectine sur les plaquettes au cours d'hémofiltration[200]. Par ailleurs, le récepteur GIIb/IIIa module également l'adhésion des plaquettes activées aux cellules endothéliales veineuses.

- Vasodilatation

La PGI2 est un vasodilatateur puissant et elle est utilisée comme traitement intraveineux chez les patients ayant une hypertension artérielle pulmonaire primitive de grade II ou IV

- Modulation de la réponse immunitaire
- Endotoxémie : l'iloprost réduit l'adhérence leucocytaire chez le rat[201]

De plus, les taux plasmatiques de prostaglandines et de thromboxanes sont corrélés avec la sévérité des atteintes d'organes chez les patients en choc septique[202].

Il est connu que la COX-2 (cyclo-oxygénase inductible) est surrégulée dans des conditions inflammatoires incluant le sepsis. L'indométhacine (inhibiteur de la COX-2) a été trouvé bénéfique il y a longtemps chez l'animal, mais l'ibuprofène n'améliore pas la réponse cardiovasculaire dans des modèles d'endotoxinémie chez le volontaire sain, et n'a pas de bénéfice dans le choc septique. L'étude de Bernard et collègues en 1997 a probablement mis un point final à l'espoir de voir les inhibiteurs des prostaglandines efficaces un jour chez l'homme.

6. CYTOKINES

Les cytokines, en plus d'induire la formation d'autres cytokines en cascade, de récepteurs de cytokines, stimulent l'expression de plusieurs enzymes comprenant l'iNOS, la COX-2[203]. La production de TNF-α, IL-1β, IL-6 après une stimulation par le LPS passe par un mécanisme régulé par le facteur nucléaire NF-κB.

Les cytokines induisent des gènes qui vont synthétiser d'autres cytokines et plusieurs autres médiateurs comme les prostanoides, les leucotriènes, le NO, la bradykinine, les ROS et le Platelet Activating Factor (PAF).

- **Exposition de courte durée**

Des récepteurs au TNF-α et à l'IL-1β existent sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses[204;205]. Le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-10 vasoconstrictent des artères

distales mammaires internes humaines de manière endothélium-dépendante passant par les récepteurs ET_A[206]. Par contre dans des vaisseaux de résistance isolées, le TNF-α et l'IL-1β ne vasoconstrictent pas des vaisseaux précontractés[207]. Dans des artérioles musculaires squelettiques chez le rat, le TNF-α n'a pas d'effet vasomoteur direct, mais si on prétraite ces artérioles avec du LPS, le TNF-α provoque une vasodilatation probablement par un mécanisme impliquant la NOS et la COX[208]. De plus, une heure d'incubation avec de l'IL-1β ou de l'IL-6 provoque une vasodilatation importante de ces artérioles *in vivo* mais pas *in vitro*, suggérant que des facteurs parenchymateux ou intravasculaires sont responsables de cet effet[209]. L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire n'affecte ni les réponses de phényléphrine (un agoniste α pur) ni celles de l'acétylcholine, mais elle prévient la chute du tonus vasculaire dans le muscle squelettique des artérioles exposées au LPS pendant une heure[210].

Chez le mouton, le TNF-α diminue 20 minutes après le début d'une perfusion les résistances vasculaires bronchiques puis les élèvent jusqu'à 2 heures après la perfusion à cause d'une sécrétion d'ET-1[211]. De la même façon, le TNF-α fait augmenter la sécrétion de l'ET-1 à des cellules endothéliales en culture[212].

- **Exposition de longue durée**

Les expositions de longue durée au TNF-α et à l'IL-1β induisent une hyporéactivité aux agents vasopresseurs. L'application de TNF-α sur les artérioles cérébrales induit une vasodilatation progressive avec un maximum atteint au bout de 4 heures. Cette vasodilatation est inhibée par l'aminoguanidine et la dexaméthasone, suggérant une implication importante du NO dérivé de l'iNOS. D'un autre côté, les cytokines peuvent augmenter les réponses de plusieurs substances vasoconstrictrices : de la noradrénaline, de l'endothéline, de la sérotonine. Par ailleurs, le thromboxane A2 issu de l'activation de la cyclooxygénase de type 2, l'$O_2^{\circ -}$ et l'H_2O_2

7. STRESS OXYDATIF

Les catécholamines peuvent être dégradées par le stress oxydatif : l'$O_2^{\circ -}$ oxyde les catécholamines dopamine, noradrénaline et adrénaline en produit oxydés stables adrénochromes et dopachromes.

Donner un équivalent de superoxyde dismutase protège de l'hypotension artérielle, de la baisse de réactivité aux catécholamines et diminue la mortalité dans un modèle d'injection d'E. coli vivant injecté chez le rat conscient avec antibiothérapie[213].

DYSFONCTION MICROCIRCULATOIRE DU SEPSIS

Les trois éléments anatomiques constitutifs de la microcirculation, artériole, capillaire et veinule peuvent être atteints lors du sepsis[214]. Les cellules endothéliales sont une cible privilégiée du sepsis.

I. ALTERATIONS ENDOTHELIALES

1. Altérations « physiques »

L'endothélium répond de façon différente à l'agression[215] suivant la nature du pathogène, certains aspects génomiques de l'hôte[216-218], l'âge[219], les comorbidités associées et la localisation dans le lit vasculaire.

Le bolus de LPS a longtemps été utilisé comme un moyen au laboratoire pour dénuder l'endothélium. Cela nécessite cependant selon les modèles des doses seuils suffisantes, suggérant une certaine résistance de l'endothélium à ce type d'agression. Par exemple, une dose « faible » de LPS peut provoquer seulement un détachement cellulaire sans vraie dénudation et s'accompagne dans le même temps d'une augmentation de la réplication endothéliale[220]. Dans un modèle endotoxinique chez le lapin, l'équipe de Vallet démontre une dénudation endothéliale au niveau de l'aorte abdominale avec un maximum de lésion à J5[221]. Il montre qu'environ 25% de l'endothélium est dénudé dans ce modèle et que la réparation demande 21 jours. Dans un modèle de LPS chez le rat et le lapin, les altérations de l'endothélium sont présentes au bout de 15 minutes seulement, avec vacuolisation nucléaire, une protrusion et un gonflemment du cytoplasme et un degré de détachement de l'endothélium variable[222]. Chez l'homme, il a été montré qu'on pouvait détecter des cellules

endothéliales circulantes au cours du choc septique (30/ml) mais aussi du sepsis (16/ml) par rapport à des patients ventilés (2,6/ml) ou des volontaires sains (2/ml)[223]. De plus, le nombre de cellules endothéliales détectées était corrélé à la mortalité. L'activation des cellules endothéliales par les médiateurs inflammatoires provoque une adhésion leucocytaire et des troubles de la perméabilité.

L'endothélium comme nous l'avons vu précédemment exprime des molécules d'adhésion leucocytaire. Ces leucocytes adhérents aux cellules endothéliales vont produire des **ROS et des protéases** qui vont léser physiquement la cellule endothéliale. Cette altération structurale endothéliale provoque une **modification membranaire et un trouble de la perméabilité**. Le TNF-α ou la thrombine par exemple peuvent augmenter la perméabilité endothéliale[224-226]. Les mécanismes exacts de ces troubles de la perméabilité ne sont pas tous connus, par exemple pour le TNF-α, le mécanisme fait intervenir une GTP binding protein puisque la toxine pertussique inhibe le processus[227]. En attendant de mieux caractériser ce phénomène on parle de « facteur de perméabilité vasculaire ». Le trouble de la perméabilité apparaît approximativement 6 heures après le déclenchement du phénomène (cf EGDT) et devient maximal en 12-24 heures[228]. **L'œdème cellulaire au niveau interstitiel** diminue d'une part la lumière endothéliale[229], d'autre part **augmente la distance intercapillaire** pour l'apport en O_2 pour les tissus. **L'adhésion des éléments figurés augmente également les résistances dans le vaisseau.**

2. Modifications de la coagulation

Le sepsis induit une activation de la coagulation[230-232] en parallèle avec celle de l'inflammation. Ainsi, le facteur tissulaire est exprimé de façon plus importante au niveau des cellules endothéliales (et également des monocytes/macrophages), ce qui active la voie extrinsèque de la coagulation, la génération de thrombine et la formation de fibrine.

En plus d'activer la coagulation, **le sepsis désactive les voies de l'anticoagulation** : réduction de l'expression de la thrombomodulline par les cellules endothéliales[233], réduction des taux circulants de protéine C activée[234], et d'antithrombine III[235]. De plus, **dans le sepsis l'activité fibrinolytique diminue[236]** : l'activateur tissulaire du plasminogène est produit en plus grande quantité par les plaquettes et les cellules endothéliales.

De plus, des microparticules procoagulantes sont générées à partir des plaquettes et des cellules endothéliales.

En résumé de ces altérations sur la coagulation, **le sepsis va globalement favoriser la formation de microthrombi et de coagulation intravasculaire disséminée** ajoutant encore à la diminution de la perfusion tissulaire.

Une fois activée la coagulation à son tour active l'inflammation enclenchant un cercle vicieux.

3. Apoptose endothéliale

Un autre facteur expliquant la dysfonction endothéliale est **l'apoptose des cellules endothéliales**. Le TNF-α[237;238], l'Il1, l'interféron, les ROS sont autant de facteurs favorisant l'apoptose endothéliale[239]. L'apoptose des cellules endothéliales, elle aussi, va avoir des effets proinflammatoires, en passant par l'expression accrue d'ICAM-1, VCAM-1, l'augmentation des ROS, la diminution des prostacyclines, un effet procoagulant[240] et enfin une adhésion plaquettaire augmentée[241]. Le LPS induit *in vitro* une apoptose des cellules endothéliales[242] bovines et ovines et promeut l'apoptose des cellules endothéliales humaines sans passer par l'expression de nouveaux gènes[243]. Cette apoptose induite par le LPS a été prouvée par des modifications morphologiques caractéristiques[244], du laddering d'ADN[245], des techniques TUNEL[246;247] et du clivage de PARP[248]. Le LPS n'a pas besoin d'intermédiaire pour provoquer l'apoptose endothéliale[249].

II. ALTERATION DE LA VASOREACTIVITE ARTERIOLAIRE

Après injection d'E. coli vivante ou d'endotoxine, les artérioles A1 et A2 se vasoconstrictent alors que les A3 et A4 se vasodilatent et que le diamètre veinulaire reste stable[250;251]. Les facteurs de régulation intrinsèques et extrinsèques peuvent tous les deux être altérés selon la circulation intéressée. Par exemple, la vasorégulation intrinsèque cérébrale semble être préservée. L'hyperhémie post-occlusive est altérée dans le muscle squelettique[252] et l'intestin[253], l'hyperhémie fonctionnelle est altérée dans le muscle squelettique[254].

Au cours du sepsis les artérioles sont moins réactives à la fois aux vasoconstricteurs et à la fois aux vasodilatateurs[255].

Le monoxyde d'azote, le **NO**, joue probablement un rôle très important dans cette baisse de réactivité. Un des facteurs majeurs évoqué pour expliquer la baisse de réactivité vasculaire dans le cadre de l'endotoxémie et du choc septique est en fait la sécrétion de quantité substancielles de NO par l'iNOS qui est dans ce contexte activée par les cytokines. Dans la paroi vasculaire, la « paralysie » de la fonction de la cellule musculaire lisse est principalement due à l'inhibition de la réponse à la noradrénaline.

- La perte de réponse à la stimulation des nerfs sympathiques et/ou à l'administration de catécholamines persiste même quand les vaisseaux sont étudiés in vitro sans contact avec les substances vasodilatatrices circulantes. Cette constatation suggère que la machinerie cellulaire est altérée. Dans une étude de Stoclet publiée en 1989, la dépression de la réponse à la noradrénaline persiste même après dénudation de l'endothélium, suggérant un mécanisme endothélium-indépendant. En revanche, l'inhibition de la voie de la L-arginine/NO, suggère un mécanisme impliquant la formation de NO par synthèse enzymatique. Les taux de GMPc sont augmentés en cas d'endotoxinémie et baissent lors de l'inhibition de la voie de la L-arginine/NO, montrant que le phénomène est GMPc-dépendant. Le site de formation de NO par l'iNOS est la cellule musculaire lisse elle-même.
- Les inhibiteurs de la voie de la L-arginine/NO ainsi que les inhibiteurs de l'effet du NO sur la guanylate cyclase (bleu de méthylène) restaurent la réponse à la stimulation nerveuse sympathique ou à la noradrénaline circulante et ce dans des modèles animaux d'endotoxinémie et de péritonite par CLP

La diminution de l'activité de la eNOS et l'activation de l'iNOS dans des tissus autres que l'endothélium (cardiomyocytes, macrophages…) ont été bien documentées. Dans des modèles animaux de sepsis, l'inhibition sélective de l'iNOS a montré une amélioration de réactivité.

Dans un modèle de CLP chez la souris [256], la réponse à la noradrénaline a été testée sur des artérioles de type A3 sensées représenter la part la plus importante de la chute de pression dans l'arbre artériel et donc un des déterminants des résistances périphériques. Avec ce même modèle, la réactivité vasculaire était améliorée, chez les souris KO pour l'iNOS, et leur survie était améliorée avec du remplissage vasculaire et des antibiotiques [257].

Les effets délétères du NO peuvent aussi être dus à un effet radicalaire des espèces réactives nitrées comme le péroxynitrite ONOO-.

Une autre possibilité est l'effet de dénudation de l'endothélium qui peut être enclenché par l'interleukine 1 (Il1) [258].

III. ALTERATION DE LA PERFUSION CAPILLAIRE

Les anomalies de la circulation capillaire ont beaucoup été étudiées au niveau du muscle strié[259]. Chez les animaux étudiés en choc septique dans cette étude de Ellis, il existe de nombreux capillaires à flux arrêté (*stopped-flow*). Dans le même temps il y a de nombreux capillaires à flux très rapide. De plus le nombre de capillaires en *stopped-flow* est corrélé à la gravité du sepsis dans les modèles animaux[260]. Le sepsis réduit le nombre de capillaires perfusés. Ce phénomène a été étudié dans un modèle de rat normotendu par CLP avec microscopie intravitale [261] et préparation de muscle long extenseur de doigt. Les auteurs retrouvaient une réduction de 36% de la densité capillaire, et une augmentation de 265 %. La distribution spatiale des capillaires était 72% plus hétérogène. La vélocité des globules rouges était 17% plus élevée.

L'augmentation du nombre de capillaires où sont retrouvés des stops de flux était reliée à :

- Des lésions des cellules endothéliales capillaires avec ballonisation, ce qui peut diminuer le diamètre capillaire et la viscosité sanguine
- La réduction de la fluidité des globules rouges résultant en une augmentation de la viscosité sanguine
- Des obstructions des capillaires par des amas de leucocytes
- De l'adhésion leucocyte-endothélium dans les veinules postcapillaires qui résulte en une augmentation de la résistance à la sortie et une réduction du shear rate

Ensemble, la distribution hétérogène du flux microcirculatoire, les vélocités plus élevées des globules rouges peuvent expliquer la difficulté d'augmenter le flux là où la demande métabolique locale peut s'en faire sentir, et pourraient expliquer la possibilité d'une saturation veineuse semblant normale au décours du choc septique.

Dans d'autres organes, la microcirculation peut être altérée : dans un modèle de péritonite par CLP [262], la réponse contractile des artérioles pulmonaires à la phényléphrine est atténuée et il y a une augmentation du nombre de leucocytes stationnaires et une fuite protéique dans les alvéoles pulmonaires. Dans le même modèle de péritonite par CLP, le nombre de capillaires perfusés de l'intestin grêle [263] est diminué.

IV. RÉPONSE INFLAMMATOIRE VEINULAIRE

En temps normal, les leucocytes interagissent peu avec l'endothélium : des forces de dispersion hydrodynamiques et des interactions électrostatiques (notamment via le glycocalyx) les repoussent. Dans le sepsis on observe rapidement un rolling des polynucléaires. L'endroit de prédilection de ces interactions leucocytes/endothélium est la veinule post-capillaire, soit pour des raisons de shear stress, soit pour des densités de récepteurs exprimés. On observe une augmentation du trafic leucocytaire veinulaire par augmentation de l'expression de glycoprotéines d'adhésion au niveau de la surface endothéliale et une augmentation de l'extravasation de l'eau et des protéines plasmatiques à cause d'une diminution de la fonction de barrière de l'endothélium veinulaire.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

V. LE GLOBULE ROUGE

Le rôle du globule rouge dans le sepsis a beaucoup moins été étudié que celui des leucocytes. Déjà en temps normal, le globule rouge doit se déformer et adapter sa taille pour passer dans des capillaires de 2 à 3 µm alors qu'il mesure environ 7 µm.

1. La déformabilité des globules rouges

Dans le sepsis, la déformabilité des GR peut être compromise par plusieurs mécanismes[264] :

- **L'interaction avec les leucocytes[265]**
- **Le stress oxydatif**
- **Les augmentations du calcium intracellulaire[266]**
- **La baisse de l'ATP**

2. Le NO transporté par l'Hémoglobine

L'augmentation du NO dans les phases initiales du sepsis augmente la formation de méthémoglobine au niveau des poumons : le NO va se fixer rapidement sur l'hémoglobine qui est en état T (tendue) c'est-à-dire avec une faible affinité pour l'O2. Le NO est délivré dans la circulation périphérique par l'hémoglobine en état R (relaxée) « ouvrant » donc la microcirculation[267]. Le NO diminue par contre la déformabilité érythrocytaire par des mécanismes peu élucidés mais évoquant des mécanismes dépendant du calcium[268]. Une action directe du NO sur le cytosquelette est évoquée, ainsi qu'une oxydation de protéines cellulaires par le péroxynitrite[269].

3. Le calcium des GR

Une homéostasie du calcium est nécessaire au maintien d'une membrane déformable. L'augmentation du calcium intracellulaire des GR a été observée lors du sepsis[270]. Elle semble dépendre de la présence de leucocytes, de ROS[271].

4. L'ATP

Les taux d'ATP des GR sont diminués dans le sepsis, ce qui peut diminuer l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la pompe calcique des GR, ce qui entraîne une augmentation du calcium intraérythrocytaire et donc une moindre déformabilité[272]. De plus, cette diminution de l'ATP peut diminuer l'effet vasodilatateur du GR.

5. L'acide sialique membranaire

Piagnerelli, de l'équipe de Jean-Louis Vincent a récemment démontré qu'une baisse de l'acide sialique chez les patients septiques entraînait une modification de la forme des GR[273]. Les mécanismes possibles de cette altération de l'acide sialique peuvent être d'origine enzymatique ou un effet direct des bactéries.

6. Les leucocytes

Les contacts directs des leucocytes avec les GR, les ROS sécrétés par les leucocytes sont des facteurs qui diminuent la déformabilité des GR à tel point qu'on peut dessiner une courbe dose-réponse de la péroxydation lipidique des GR par les leucocytes[274].

La figure 12 résume les altérations possibles du GR lors du sepsis.

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

VI. DYSFONCTION MICROCIRCULATOIRE CHEZ L'HOMME

1. Techniques laser-doppler : l'hyperhémie fonctionnelle est altérée

a. La peau

Une des premières études chronologiques est allemande, réalisée par Wolfgang H. Hartl[275] en 1987. Dans cette étude prospective, les auteurs évaluent la réponse lors d'une pléthysmographie à jauge de contrainte d'une **hyperhémie réactionnelle** après gonflage d'un brassard à 200-220 mmHg (valeurs suprasystoliques) pendant 3 minutes. La population étudiée est constituée de patients contrôles, 10 patients de chirurgie qui ont subit dans les deux jours précédents une chirurgie vasculaire majeure et de 12 patients en sepsis. Les patients du groupe septique montrent au repos par rapport aux patients contrôles une augmentation du flux de l'avant bras avec une diminution des résistances vasculaires. Les mesures sont quotidiennes chez tous les patients septiques. Au début de l'histoire septique, la réponse en réaction à l'hyperhémie est comparable avec les patients contrôles. Par contre, alors que des défaillances d'organes apparaissent chez 9/12 des patients septiques, la réponse hyperhémique disparaît. De façon intéressante, la modification (perte) de la réponse hyperhémique survient de façon brutale d'un jour à l'autre (8 +/- 2 jours) chez les patients septiques au cours de l'évolution de leur maladie et aucun critère « macroscopique » ne permet de le prévoir, ni hémodynamique, ni biologique. La plupart de ces patients vont mourir

(7/12) dans les 4 +/- 2 jours après l'apparition de la non réactivité vasculaire. Les 2 survivants septiques de l'étude étaient les plus jeunes (48 et 53 ans). Avant la sortie, les anomalies se sont corrigées chez ces deux patients, les modifications ayant duré 8 jours pour l'un et 3 jours pour l'autre. Les messages de cette étude sont donc à l'époque : les anomalies microcirculatoires ne sont pas constantes au cours du sepsis. La gravité des patients est corrélée à l'absence d'hyperhémie réactionnelle, tous les patients décédés ayant cette anomalie. La perte de l'hyperhémie chez les patients septiques est par contre réversible.

Une étude nord-américaine de 1995 s'intéresse à la dynamique du flux sanguin cutané chez les patients septiques[276]. Une étude laser-doppler est réalisée au niveau de l'avant-bras. La période d'ischémie est là de 2 minutes et les auteurs enregistrent encore le flux doppler pendant 5 minutes pour étudier le délai de normalisation du flux. Les anomalies majeures retrouvées chez ces patients sont une augmentation du temps de normalisation du flux (1,5 à 2 fois plus long) chez les patients septiques par rapport aux patients contrôles, et une réduction de 3 à 4 fois du pic d'hyperhémie.

Une autre étude teste la réponse microcirculatoire cutanée endothélium-dépendante et endothélium-indépendante par technique de laser-doppler couplé à une technique de iontophorèse[277]. L'acétylcholine (Ach) pour tester la vasodilatation endothélium-dépendante et le nitroprussiate de sodium (SNP) pour tester la vasodilatation endothélium-indépendante. Les réponses sont toutes les deux diminuées par rapport au groupe contrôle et volontaires sains avec un rapport d'augmentation de la réponse à l'Ach sur l'augmentation de la réponse au SNP qui est identique entre les groupes sepsis, contrôles et volontaires sains. Ce rapport est constant au cours du temps et identique entre des patients septiques de gravité différente, notamment en terme de pression artérielle, doses de noradrénaline requises, lactates. Cela amène à penser que la réponse de la microcirculation cutanée à la vasodilatation est amoindrie lors du sepsis mais conservée, suggérant un recrutement possible.

b. Le muscle

En 1996, Rémi Nevière[278] retrouve des anomalies microcirculatoires en étudiant l'hyperhémie réactionnelle au niveau du muscle squelettique de la jambe de patients en état de choc septique. L'étude comporte 10 patients BPCO dans les 48 premières heures de mise en

route d'une ventilation artificielle et 16 patients en sepsis sévère. La délivrance en O2 est augmentée avec des résistances vasculaires systémiques abaissées comme attendu. Les résultats intéressants concernent l'absence de vasomotion dans le groupe sepsis par rapport au groupe BPCO, le pic d'hyperhémie significativement abaissé et la durée de l'hyperhémie significativement augmentée dans le groupe de patients septiques. Le flux sanguin au repos, ou après épreuve d'hyperhémie n'était pas corrélé aux données macrohémodynamiques : index cardiaque, résistances vasculaires systémiques, transport en O2, extraction en O2.

2. Techniques d'imagerie par OPS

a. Les anomalies microcirculatoires sublinguales sont réversibles

La première étude permettant de réellement constater de façon visuelle et indiscutable les anomalies microcirculatoires lors du sepsis provient de l'équipe de De Backer en 2002[279] qui constate des anomalies sublinguales par technique OPS chez des patients en état de choc septique. Cinquante patients en sepsis sévère ont été étudiés, ainsi que 10 volontaires sains, 16 patients avant chirurgie cardiaque et 5 patients de réanimation non infectés. Les variabilités intra et inter-individuelles étaient mesurées (inférieures à 10%). Un test pharmacologique avec de l'acétylcholine était également réalisé parmi 11 patients en état de choc septique, avec l'application d'une compresse imbibée sur la langue pour tester la réversibilité des anomalies microcirculatoires. La proportion de petits vaisseaux diminuait chez les patients en sepsis par rapport aux contrôles. De plus, la proportion de vaisseaux non perfusés ou perfusés de façon intermittente était plus importante dans le groupe de patients en état septique. La densité de vaisseaux perfusés diminuait également.

Un point important est que **ces anomalies microcirculatoires sont réversibles** en tout cas jusqu'à un certain point : dans l'étude princeps De Backer réverse les anomalies par application topique d'acétylcholine. Spronk, la même année, améliore l'indice de flux microcirculatoire sublingual de 8 patients en état de choc avec de la nitroglycérine donnée par voie générale chez des patients qui ont bénéficié d'un remplissage préalable importante avant le test[280].

b. La persistance d'anomalies microcirculatoires sub-linguales est corrélée à un mauvais pronostic

Dans l'étude de De Backer, la persistance d'anomalies microcirculatoires sub-linguales par la même technique d'imagerie était associée à la survenue de défaillance d'organe et au décès[281]. Cela n'est évidemment pas une preuve de causalité, mais cela signifie que l'on peut repérer des patients qui ont un pronostic plus sévère et espérer améliorer leur pronostic.

c. Les anomalies microcirculatoires sublinguales peuvent s'améliorer par des traitements

De Backer observe une amélioration de la microcirculation sublinguale par la dobutamine sans même qu'il n'y ait de modifications hémodynamiques[282] et par la protéine C activée 4 heures après le début de la perfusion[283]. De façon intéressante, dans l'étude de De Backer sur la dobutamine, la baisse des taux de lactates était corrélée à l'amélioration de la perfusion capillaire et non à l'augmentation de l'index cardiaque. La dobutamine ne recrutait pas complètement la perfusion capillaire, mais l'adjonction encore une fois d'acétylcholine augmentait cette perfusion presque à 100%.

d. Les anomalies sublinguales existent aussi dans le contexte d'optimisation thérapeutique précoce (EGDT)

Récemment, les investigateurs du MARS[284] (Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock) ont conduit une étude observationnelle prospective chez 26 patients septiques en utilisant de l'imagerie par OPS dans un contexte d'EGDT (thérapeutique précoce adaptée à des buts préfixés). Cinq patients « contrôles » volontaires sains ont été également étudiés. De façon intéressante, les auteurs ont choisi d'étudier entre autre la corrélation entre des données hémodynamiques macrocirculatoires PAM, et la composante cardiovasculaire du score SOFA. Cette dernière composante tient compte du degré de besoin en vasopresseurs. Au moment de leur étude sublinguale, les patients septiques avaient des degrés variables du

nombre d'objectif atteint entre la PVC, la PAM et la SvO2. La moitié des patients avaient deux des trois critères remplis. En comparant les données concernant les patients septiques par rapport aux contrôles : le score de vélocité est plus bas, l'index d'hétérogénéité est plus élevé, la densité capillaire est moindre. Cinquante huit pourcent des patients survivent jusqu'à leur sortie de l'hôpital. Le score de vélocité, l'index d'hétérogénéité sont plus perturbés chez les non survivants, mais pas la densité capillaire. Les autres facteurs « macroscopiques » différents entre les survivants et les non-survivants sont la pression artérielle moyenne (PAM), le score SOFA et plus particulièrement sa partie cardiovasculaire, et les lactates sanguins. Le score de vélocité est corrélé à la PAM, et inversement corrélé à la composante cardiovasculaire du SOFA, l'index d'hétérogénéité est inversement corrélé à la PAM, et positivement corrélé à la composante cardiovasculaire du SOFA. La SvO2 était inversement corrélée à l'index d'hétérogénéité et à la densité capillaire. Les limitations de cette étude sont l'absence de mesures séquentielles chez un patient donné pendant toute la durée de la réanimation (6 heures), et l'hétérogénéité du moment de la mesure suivant les différents patients. Cette étude, contrairement aux études précédentes, trouve une corrélation entre des données microcirculatoires et macrocirculatoires et des paramètres d'oxygénation globale. Une des hypothèses expliquant ce phénomène pourrait être l'étude précoce de la microcirculation. Les indices de perfusion microcirculatoires sont plus sévères chez les patients non survivants que chez les survivants y compris regardés tôt pendant une EGDT. **Cette étude prouve que les anomalies microcirculatoires sont très précoces**, le lien de cause à effet entre anomalie microcirculatoire et mortalité n'est évidemment pas prouvé, puisque ces anomalies peuvent aussi représenter la gravité des patients sans que ces anomalies soient délétères par elles-mêmes.

e. Les anomalies de la microcirculation détectées par OPS sont hétérogènes suivant l'endroit étudié

Cette année également, l'équipe d'Ince[285] a montré que **les modifications de la microcirculation étudiées de façon simultanée en sublingual et au niveau de colostomies ou d'iléostomies n'étaient pas corrélées entre elles au 1er jour du sepsis**. Cela signifie que les critères de jugement d'une éventuelle étude qui testerait des thérapeutiques guidées par la microcirculation sont extrêmement difficiles à choisir. Evidemment l'accessibilité à une

stomie digestive n'est pas le lot commun alors que la langue est quasiment toujours accessible.

SYNDROME DE DEFAILLANCE MICROCIRCULATOIRE ET MITOCHONDRIALE (MMDS) LORS DU SEPSIS

Logo du MMDS lors du 2ième congrès consacré à ce syndrome en 2005

I. LA MICROCIRCULATION ENTRAINE UNE HYPOXIE

1. Notion d'unités microcirculatoires "fragiles"

La vidéofluorométrie de NADH a permis à l'équipe de Can Ince de mesurer les changements d'oxygénation au niveau du myocarde de rat[286]. En condition d'ischémie, le signal est fort indiquant des taux élevés de NADH. La reperfusion du myocarde après cette période d'ischémie montre une inhomogénéité de la reperfusion –c'est-à-dire que des unités retournent en normoxie moins vite que d'autres- et ce au niveau de l'endocarde comme de l'épicarde[287]. Ces **unités microcirculatoires fragiles (UMF)** sont les premières à devenir hypoxiques lors d'une augmentation trop rapide de la fréquence cardiaque. Pour un cœur donné, ces zones sont toujours localisées au même endroit. Par des techniques de phosphorescence et l'injection de microsphères, Ince a prouvé que ces UMF étaient des

capillaires. Ce résultat est corroboré par une analyse très fine *in vivo* [288] au niveau du myocarde de rat également qui apporte comme renseignements supplémentaires que les unités microcirculatoires qui sont bien oxygénées jouxtent les artérioles alors que les UMF jouxtent les veinules. Dans un modèle d'endotoxinémie chez le rat, Ince[289] a montré que l'inhibition de la synthèse de NO par les NOS "éclairait" les UMF chez les rats septiques et non chez les contrôles. De plus, l'augmentation du débit coronaire et de la consommation en O_2 retrouvée chez les rats septiques était annulée par l'inhibition des NOS.

Ces observations fondamentales de Ince l'amènent à penser que **ces UMF peuvent exister dans tous les organes et devenir à risque d'hypoxie lors du sepsis[290].**
Les villosités intestinales peuvent selon lui être regardées comme des UMF de l'intestin. En effet, la proximité immédiate de l'artériole nourricière et de la veinule affluente à la base des villosités résulte en un shunt diffusionnel des artérioles vers les veinules, shuntant ainsi la microcirculation[291]. Cette vulnérabilité anatomique d'apport en O_2 est bien connue dans le sepsis. Au niveau rénal, l'étude du ratio du débit sanguin entre cortex et médullaire grâce à des microsphères prouve que le cortex est plus fragile lors du sepsis[292]. Dans le muscle squelettique du chat, par la même méthode de fluorescence au NADH, une équipe n'a pas retrouvé d'UMF[293]. C'est peut-être une des explications de la relative résistance du muscle dans le sepsis[294;295].

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

2. Le « PO_2 gap » et le shunt microcirculatoire

L'existence d'UMF implique directement la présence de shunts microcirculatoires et devrait impliquer des valeurs de PO2 microcirculatoire plus basses que les valeurs de PO2 veineuse. Gutierrez l'a prouvé au niveau du muscle squelettique de lapin[296] et Ince au niveau de l'iléon de cochon[297]. Dans ce dernier modèle de choc hémorragique, le PO2 gap était annulé par le remplissage par des cristalloïdes.

Ince met alors au point un modèle d'endotoxémie chez le cochon où la perfusion continue lente de LPS est stoppée quand la pression artérielle a chuté de 25 %. Le PO2 gap augmente au cours du temps dans ce modèle et c'est la première variable à se détériorer en même temps que le PCO2 de la tonométrie gastrique. Ce PO2 gap est plus important dans le choc septique que dans le choc hémorragique (voir figure 18).

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

Quels sont les mécanismes pouvant expliquer ce shunt microcirculatoire ?

- Des **anastomoses anatomiques artérioveineuses** réalisant un shunt convectif. Ces shunts existent effectivement dans différents organes comme le myocarde[298] et le pancréas[299]. Dans le sepsis une étude retrouve une augmentation de ces anastomoses dans le muscle squelettique[300].
- Une **diffusion directe de l'O_2 des artérioles vers les veinules avoisinantes**, ce mécanisme a été montré par des spectrophotométries de l'hémoglobine sur cellule unique dans le muscle[301], dans les coronaires en cas de bas débit[302].
- Une **inhomogénéité architecturale microcirculatoire ou « vol vasculaire »**, où des unités détournent une partie du débit par vasodilatation sélective[303] et on peut imaginer que des microthrombi et l'œdème interstitiel rencontrés dans le sepsis pourraient aggraver ce type de shunt
- **Une incapacité de l'hémoglobine à délivrer son O_2 pendant son temps de transit capillaire[304]**, et ce d'autant que les conditions de saturation veineuse sont basses.

La translation en clinique de ces notions implique probablement si cette théorie de shunt est vraie que l'utilisation de vasopresseurs a probablement un coût microcirculatoire et que ces médicaments augmentent probablement le shunt préexistant ou le créent. Les études de tonométrie gastrique montrent par exemple une amélioration par les inotropes des variables globales et régionales mais laissent l'estomac dysoxique. Cette théorie a été aussi le début du rationnel pour proposer des vasodilatateurs dans le choc septique[305].

Un autre traitement qui peut améliorer l'oxygénation microcirculatoire est l'utilisation de solutions d'hémoglobine qui améliorent l'oxygénation tissulaire et améliore l'extraction en O2 dans un modèle expérimental.

Le déficit d'extraction en O2 dans le sepsis peut être expliqué en théorie par ces unités UMF ou par la mitochondrie elle-même et cette responsabilité de l'un ou de l'autre fait encore débat. La présence d'anomalies microcirculatoires sans anomalie mitochondriale dans certains modèles fait pencher la balance vers une responsabilité initiale de la microcirculation[306].

Ces notions de PO_2 gap et de shunt microcirculatoire peuvent expliquer pourquoi des patients peuvent avoir des valeurs hémodynamiques globales satisfaisantes, des valeurs

d'oxygénation générale (SvO_2 ou $SvcO_2$) normales avec une perturbation microcirculatoire et une dysoxie tissulaire, notion appelée choc « cryptique ».

Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.

II. LA THEORIE DE LA CYTOPATHIE HYPOXIQUE

Cette théorie a été énoncée par Fink en 1997[307]. La théorie de Fink est que les altérations du métabolisme cellulaire lors du sepsis doivent probablement être liées à une **difficulté intrinsèque de la cellule à utiliser l'O_2 disponible** plus qu'une difficulté de l'organisme de délivrer l'O_2 aux cellules[308].

1. Les arguments dans les modèles animaux

Si l'hypoperfusion était le déterminant principal de la dysfonction cellulaire septique, les valeurs de pression en oxygène au niveau des tissus devraient se trouver abaissées. C'est tout l'inverse que l'on constate dans les modèles animaux : **la PO_2 tissulaire est normale ou augmentée lors du sepsis.**

Dans un modèle de CLP chez le rat réanimé la PO_2 musculaire squelettique est identique chez les rats septiques par rapport aux contrôles[309]. Hotchkiss montre dans un modèle de sepsis chez le rat par l'absence de rétention d'un dérivé radiomarqué se fixant aux macromolécules en conditions hypoxiques (le [^{18}Fluoroinsonidazole]), que le muscle squelettique et le foie ne sont pas hypoxiques par rapport aux contrôles[310].

Dans un modèle de LPS chez le porc réanimé, VanderMeer trouve une PO_2 muqueuse iléale augmentée[311]. Dans un modèle de LPS chez le rat, c'est la PO_2 vésicale qui est augmentée[312]. Une autre approche renforce cette impression : si on regarde grâce à de la spectroscopie dans le proche infrarouge le statut rédox du cytochrome oxydase aa_3 dans un modèle de sepsis chez le babouin par injection d'E.coli vivant[313], il apparaît au bout de 18 heures une diminution du taux de réduction de cette enzyme, qui peut s'interpréter comme

soit un défaut de l'enzyme à accepter des électrons, soit une diminution de la disponibilité de substrats équivalents réducteurs (NADH et FAD). Dans ce modèle, cette cytopathie hypoxique semble donc être « tardive ». De façon intéressante aussi, les taux de réoxydation de l'enzyme après des ischémies répétées au garrot, étaient au début de l'étude (au temps 6 heures) diminués. Cela indique probablement au temps précoce une baisse de la délivrance en O_2.

2. Les arguments chez l'homme

Les arguments chez l'homme en faveur de l'existence de cette cytopathie sont que si une approche très précoce et très agressive de l'optimisation de la saturation veineuse en O_2 améliore grandement le pronostic des patients en état de choc septique[314], cette approche est, au mieux inefficace[315;316] voire délétère[317] si elle est menée plus tard dans l'histoire du sepsis. Ce n'est donc pas l'essence qui manque à la pompe mais l'opercule du réservoir qui n'est pas complètement ouvert : **l'augmentation de la délivrance en O2 n'améliore pas le pronostic lors du sepsis.**

De plus, **la PO2 est normale ou augmentée chez l'homme dans le muscle squelettique notamment[318;319]**.

3. Les mécanismes proposés :

a. L'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH)

Le produit final de la glycolyse est le pyruvate qui peut soit être réduit en acide lactique, soit entrer dans le cycle des acides tricarboxyliques. La PDH catalyse la formation d'acétylcoenzyme-A en présence de NAD+ et de coenzyme A. A part le rétrocontrôle par les produits finaux de la chaîne, la phosphorylation joue un rôle primordial dans la régulation de l'enzyme :

- La PDH kinase catalyse la phosphorylation de la PDH et donc l'inactive
- La PDH phosphatase catalyse sa déphosphorylation et l'active

Or l'activité de la PDH kinase est diminuée dans le muscle strié lors du sepsis diminuant ainsi l'activité de la PDH[320-323].

L'excès de pyruvate va provoquer une augmentation du taux de lactates qui n'a donc pas de lien avec la baisse de la délivrance en O_2.

b. L'inhibition du cytochrome a,a_3 par le NO

Même à des concentrations physiologiques, le NO est capable d'inhiber de façon réversible mais rapide le cytochrome aa_3 ou complexe IV de la chaîne respiratoire[324-327]. Le NO rentre en compétition pour se fixer sur le cytochrome aa_3 sur le même site que l'O_2[328;329], expliquant une inhibition encore plus importante en conditions de faibles PO_2 locale. Dans le contexte du sepsis on a déjà vu que les taux de NO pouvaient être augmentés de façon très importante.

c. L'inhibition par le péroxynitrite des enzymes mitochondriales

Le peroxynitrite est un dérivé prooxydant non radicalaire provenant de l'association de l'$O2°^-$ et du NO°. Dans le sepsis, la formation de peroxynitrite est augmentée. D'une part la mitochondrie génère en permanence un fond continu d'$O2°^-$ par le biais des boucles enzymatiques impliquant le coenzyme Q_{10}, d'autre part la disponibilité du NO est augmentée y compris au niveau de la mitochondrie elle-même qui peut en synthétiser via une NO synthase mitochondriale[330-334].

Au laboratoire *in vitro*, **le peroxynitrite inhibe de façon irréversible la respiration mitochondriale.**

Le péroxynitrite inhibe :

- **La F0F1ATPase qui phosphoryle l'ADP en ATP[335]**
- **Le complexe I[336]**
- **Le complexe II[337]**
- **L'aconitase[338;339]**

L'aconitase est une enzyme du cycle des acides tricarboxyliques qui convertit le citrate en isocitrate.

d. L'hypothèse de la poly(ADP-ribose) polymérase

La PARP-1 est une enzyme nucléaire qui participe à la réparation de l'ADN[340], sa réplication[341] et qui est impliquée dans l'apoptose[342]. Une fois activée par les cassures simple brin de l'ADN, elle catalyse le clivage du NAD+ en ADP-ribose et nicotinamide et la polymérisation des ADP-ribose en homopolymères de poly(ADP-ribose). Or ces cassures simple brin peuvent être provoquées par différents oxydants. Parmi ces oxydants, le peroxynitrite active la PARP-1 et peut donc par ce biais également inhiber la respiration mitochondriale[343]. Cela est vrai également dans les macrophages activés[344] et dans les cellules musculaires lisses vasculaires[345]. **L'activation de la PARP diminue le contenu cellulaire en NAD^+/NADH**. *In vitro*, une expérience élégante a été menée sur des cellules Caco-2[346]. Ce sont des entérocytes humains. L'incubation de ces cellules avec du cytomix, un mélange de TNF-α, d'IL1β et d'IFN-γ, diminue la consommation d'oxygène de plus de 50% et de façon significative les taux de NAD^+/NADH. Si le milieu est lavé, la consommation est restaurée. Par ailleurs elle est restaurée par des piègeurs de $O2°^-$, de NO, des catalyseurs de dégradation du peroxynitrite, par un inhibiteur de PARP-1. En utilisant des liposomes pour que l'apport de NAD+ soit possible pour la mitochondrie, les taux de respiration mitochondriale approchait les 85% des valeurs contrôles.

Par ailleurs, **l'inactivation de la PARP-1 dans des modèles animaux** cette fois permet de prévenir la dysfonction contractile vasculaire dans des modèles de LPS chez les rats[347;348], de diminuer la mortalité dans des modèles de péritonite bactérienne létale chez le porc[349].

De plus, les souris KO pour le PARP-1 sont relativement résistantes aux effets létaux du LPS[350;351]. L'ajout de sérum issu de patients septiques ou issu de patients contrôles à des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) diminue la respiration mitochondriale environ de moitié, ceci étant prévenu par un prétraitement par un inhibiteur de NOS ou un inhibiteur de PARP[352].

III. LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE EST ADAPTATIVE

La théorie que les anomalies mitochondriales sont adaptatives est défendue notamment par l'équipe de Mervyn Singer[353]. En effet, les patients en état de choc septique présentent une mortalité d'environ 50% seulement. Si les tissus étaient tous hypoxiques avec des dommages cellulaires, ils devraient être irréversibles, or la nécrose tubulaire aiguë ne conduit quasiment jamais à l'hémodialyse définitive[354], les hépatites fulminantes sont extrêmement rares lors du choc septique. De plus, même au stade de l'autopsie, les anomalies histologiques à type de nécrose ou d'apoptose[355] sont extrêmement rares. Toutes ces constatations suggèrent un déficit fonctionnel plus qu'organique et donc possiblement réversible. La sévérité du sepsis est corrélée à la baisse de la consommation en O_2[356] et inversement corrélée à une augmentation de la pression tissulaire en O2[357], dans un contexte de diminution du nombre de vaisseaux perfusés au niveau microcirculatoire[358]. On pourrait rapprocher ce phénomène à l'effet « Robin des Bois » au niveau microcirculatoire lors de l'exposition à l'hyperoxie[359], où les vaisseaux se vasoconstrictent dans les territoires bien oxygénés et redistribuent de ce fait le débit microcirculatoire vers les unités microcirculatoires moins oxygénées.

La persistance de taux d'ATP est associée à la survie chez les patients en état de choc septique, alors que le complexe I au moins de la chaîne respiratoire a été inhibé, ce qui suggère la possibilité pour les cellules de réduire leur métabolisme. Singer propose que les cellules se mettent **en état d' « hibernation »**, pour augmenter les chances pour un organe donné de récupérer sa fonction une fois l'orage passé. Pour Singer les mécanismes d'induction de cette hibernation sont dépendants des **cytokines** d'une part et du **système endocrinien** d'autre part. Les hormones de stress sont sécrétées lors de la phase aiguë : cortisol, catécholamines, vasopressine, glucagon, hormone de croissance[360]. Toutes ces hormones ont pour but, ou en tout cas comme propriété d'aider à maintenir une circulation et

une oxygénation efficaces. Elles provoquent une augmentation des substrats énergétiques sous forme de glucose, acides gras, et acides aminés qui proviennent des stocks de l'organisme, tout spécialement le foie et le muscle et elles augmentent la synthèse de l'ATP mitochondrial et non mitochondrial. La consommation totale en O2 (VO2) est augmentée, avec un métabolisme qui peut être multiplié par deux. En parallèle, les fonctions gonadiques et l'anabolisme sont mis au repos. Il existe une insulinorésistance dans laquelle le NO via l'activation de l'iNOS[361], les cytokines et les hormones de stress ont été impliquées[362].

Dans la phase plus tardive, en terme d'heures ou de jours, le profil hormonal se modifie substantiellement avec une diminution importante des taux de vasopressine, une diminution de la réponse à l'ACTH malgré une cortisolémie normale, un syndrome d'euthyroïdie clinique[363].

De plus l'amplitude des variations des taux sanguins de ces hormones peut être corrélée au pronostic[364;365].

La mitochondrie possède des **récepteurs aux glucocorticoïdes et aux hormones thyroïdiennes[366]**.

Le **statut thyroïdien** est corrélé à la consommation d'oxygène, à la production maximale d'ATP, et à la fois la quantité et l'activité des enzymes respiratoires[367;368]. Un excès d'hormones thyroïdiennes augmente le taux de synthèse maximale d'ATP mais en réduit son efficacité[369]. Le tableau d'euthyroïdie clinique peut peut-être par analogie s'associer à une diminution de la respiration mitochondriale mais qui devient plus efficace. Un argument en clinique est que la VO_2 –dépendance chez des patients en sepsis était corrélée aux concentrations de T_3 et de T_4 dans le plasma, mais pas aux taux de lactates, de catécholamines, ou de cortisol[370].

L'impact des corticoïdes semble dépendre plus de la durée d'exposition : chez le rat, un stress aigu augmente l'activité du complexe IV, alors qu'un stress chronique intermittent diminue la fonction mitochondriale[371].

Les catécholamines induisent une augmentation aigue d'activité mitochondriale, de VO_2 et d'ATP.

L'inhibition de la respiration mitochondriale par le NO, les ROS couplée à une réduction de la stimulation hormonale et le rétrocontrôle positif de la diminution de la demande métabolique concourt à une diminution de la production d'énergie. La baisse de la formation de l'ATP, elle aussi, exerce un effet négatif sur les voies métaboliques.

L'équipe de Singer a développé récemment un **modèle de péritonite réanimée chez le rat avec un sepsis chronique** et ses résultats étayent cette théorie d'étiologie bioénergétique de la défaillance multiviscérale[372].

Brealey vient de montrer[373] chez l'homme que l'altération de la fonction mitochondriale musculaire associée à une **déplétion en ATP était corrélée à la mortalité**.
Cependant la mitochondrie intervient dans de nombreuses autres voies physiologiques dans la cellule, comme **l'homéostasie du calcium**, **le métabolisme lipidique, le métabolisme protidique, la régulation des ROS, et l'apoptose de la cellule[374]**.
Une étude très intéressante appuie récemment cette thèse d'une anomalie autre que sur la chaîne respiratoire elle-même[375]. Elle utilise l'analyse de la **protéomique des mitochondries** de foie lors d'un modèle d'endotoxémie chez le félin réanimé.

La pathogénie de la dysfonction mitochondriale dans le sepsis[376] est complexe. Une inhibition directe de la respiration mitochondriale par de nombreux acteurs du sepsis est possible : en effet le NO, les ROS, et d'autres médiateurs inflammatoires peuvent directement l'inhiber.

- **Le NO**

(comme le CO) se lie de façon compétitive avec l'O_2 sur le cytochrome oxydase (complexe IV), diminuant ainsi son activité enzymatique d'une part, bloquant ainsi le transport d'électrons et amenant à la formation d'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$
Comme l'inhibition du complexe IV par le NO est compétitive avec l'O2, il s'ensuit que s'il préexiste une hypoxie cellulaire, le complexe sera d'autant plus inhibé[377].

- **Les modifications endocrines**

Les hormones thyroïdiennes[378], les hormones sexuelles[379;380], l'insuline[381], les glucocorticoïdes[382] et la leptine[383] peuvent moduler positivement autant de fonctions que la production énergétique, la synthèse protéique, et la biogenèse des mitochondries.
Or, des syndromes de basse T_3[384;385], l'insulinorésistance[386], l'insuffisance surrénale[387;388], des taux circulants bas de leptine[389] ont été reportés chez les non survivants par rapport aux survivants lors de sepsis prolongés.

A côté de **l'inhibition fonctionnelle** de la chaîne respiratoire, il semble que la **régulation des gènes** puisse intervenir pour la formation de nouvelles protéines de la chaîne respiratoire. Par

exemple, chez des volontaires sains, l'administration d'endotoxine diminue l'expression de gènes de leucocytes circulants codant pour **l'ATP synthase** et pour des **protéines de la chaîne respiratoire**[390].

IV. IMPACT DES MEDIATEURS INITIAUX DU CHOC SEPTIQUE SUR LA MITOCHONDRIE

1. Le TNF-α, voie des sphingolipides et apoptose

Le TNF-α, en se fixant sur son récepteur spécifique TNFR-1 active la sphingomyélinase qui va cliver la sphingomyéline en céramide et phosphorylcholine.

Les concentrations de TNF-α et de céramides sont retrouvées élevées dans le sang et les tissus de patients septiques[391].

Le céramide est capable d'activer les caspases. Les caspases sont des enzymes très actives biologiquement et qui peuvent agir au niveau du noyau et de la mitochondrie.

Les dérivés des céramides favorisent la transition de perméabilité de la mitochondrie (TPM)[392], et donc le relargage de cytochrome c vers le cytosol[393], l'activation de la caspase 3 effectrice[394] et donc la mort cellulaire par apoptose. BAX, un promoteur de l'apoptose, est colocalisé avec les céramides au niveau du foie au bout de 4 heures d'un challenge au LPS, et leurs capacités à induire une transition de perméabilité sont synergiques[395]. Un prétraitement par **cyclosporine A**, inhibiteur de cette transition de perméabilité protège de la dysfonction de la membrane interne de la mitochondrie mais pas de l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe[396].

La **surexpression de Bcl-2**, un inhibiteur endogène de BAX[397], diminue l'apoptose intestinale et lymphocytaire[398;399] et améliore la survie dans des modèles de sepsis.

Cependant la mort cellulaire –je veux dire la perte « sèche » de cellules- est probablement insuffisante pour expliquer la défaillance d'organes lors du sepsis[400].

Les mitochondries par contre ont une vie plus courte que la cellule et sont donc synthétisées, probablement suite à des signaux nucléaires[401]. On en connaît plus sur leur fin : les mitochondries sénescentes sont d'abord dégradées par des enzymes endogènes (**autolyse**), puis digérées complètement par les lysosomes du cytoplasme (**autophagie**)[402].

De plus, à fortes doses (millimolaire), les céramides inhibent la phosphorylation oxydative et accélèrent la production de ROS[403]. Les mitochondries sénescentes sont plus susceptibles à la transition de perméabilité[404] et cette transition de perméabilité promeut l'autophagie par des mécanismes non élucidés[405]. Il n'est donc pas étonnant qu'un agent agissant sur le pore de transition, le TNF-α, accélère la clairance des mitochondries des cellules parenchymateuses en quelques heures[406].

Dans un modèle non létal de sepsis, une déplétion en cytochromes était noté à J6 du début du sepsis[407]. Il semble élégant de penser que la phase de récupération du sepsis nécessite un renouvellement des mitochondries qui subissent pendant la phase aigue déjà trop de « challenges » métaboliques[408]. Lors de la phase de récupération du sepsis d'ailleurs, chez les survivants d'un choc septique, il apparaît que l'amélioration de la respiration mitochondriale est corrélée de façon positive avec la récupération de la fonction des organes[409].

2. Stress oxydatif

La majeure partie des ROS formés est issue de la formation d'anion superoxyde par diversion d'électrons du complexe I qui se fixe à l'oxygène. Cet anion superoxyde va immédiatement se combiner au NO pour donner naissance au **peroxynitrite**[410] ou être réduit par la SOD.

La balance prooxydant/antioxydant est déséquilibrée lors du sepsis.

Dans les « entrées » il y a une **altération de la phosphorylation oxydative** détournant des électrons dans la formation d'anions superoxydes et donnant naissance au peroxynitrite.

Cette altération de la phosphorylation oxydative est le fait de :

- L'induction de la transition de perméabilité
- Des dégâts structuraux de la membrane[411]
- L'altération du fonctionnement des cytochromes[412;413]

Le peroxynitrite peut altérer de façon réversible ou irréversible le fonctionnement de nombreuses protéines mitochondriales. Notamment il peut inhiber le complexe I[414] et les complexes II et V de la chaîne respiratoire d'une part, et d'autre part il peut inhiber l'aconitase.

Dans les « sorties »

- La **MnSOD,** superoxyde dismutase à manganèse **est une enzyme antioxydante spécifique de la mitochondrie.** Elle catalyse la transformation d'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2, détoxifié par la glutathion peroxydase pour donner de l'eau ou par la catalase.

  Le **LPS[415] et le TNF-α[416] induisent l'expression de la MnSOD**, probablement en réponse à la formation des radicaux libres[417]. Cette augmentation d'activité serait peut être suffisante à enrayer la production d'anions superoxydes mais
- **l'activité de la catalase est compromise dans le sepsis[418]**. L'accumulation de peroxydes d'hydrogène entraîne la formation de radicaux hydroxyles $OH^{\circ -}$ par la réaction de Fenton (en présence de Fer libre) ou la formation de radicaux alkoxyles à partir des lipides péroxydés. Les radicaux hydroxyles et alkoxyles réagissent à leur tour avec de nombreuses molécules biologiques et les membranes lipidiques[419], y compris des composants mitochondriaux[420] promouvant probablement encore plus la formation de radicaux libres selon un cercle vicieux.

3. Altérations métaboliques

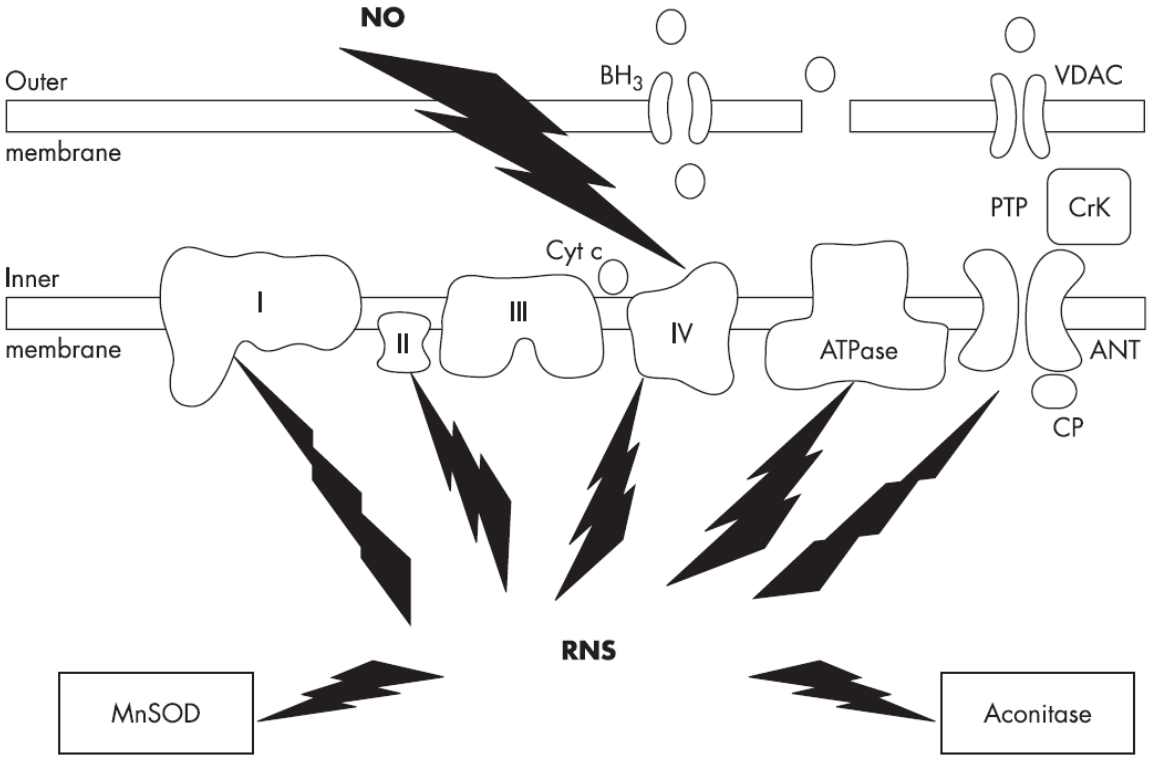
a. Cycle de l'urée

L'expression de la CSP-1 qui catalyse la première réaction du cycle de l'urée et de l'OTC (ornithine transcarbamylase) qui catalyse la deuxième réaction du cycle de l'urée est augmentée 4 heures après l'injection de LPS chez le félin réanimé[421]. Ces résultats sont en accord avec une augmentation de ces enzymes et de l'augmentation de la glutamine et de l'ammoniaque (substrats de la formation de l'urée) dans le foie dans un modèle de CLP chez

le rat[422]. Par ailleurs la consommation splanchnique d'**arginine** -à la fois métabolite intermédiaire du cycle de l'urée et substrat de la **formation de NO**- augmente de façon très importante dans le sepsis[423;424]. On pense que les stocks d'arginine sont de plus en plus faibles au cours du sepsis et que cela se traduit par une dysimmunité[425].

b. Métabolisme des lipides

On a retrouvé une diminution des enzymes clés du métabolisme lipidique dans le foie après LPS. L'HMG-CoA synthase diminue énormément dans les mitochondries, ce qui a des implications sur la cétogenèse, le métabolisme du cholestérol et des hormones associées.



RESULTATS

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La préoccupation constante de vouloir comprendre la physiologie et la physiopathologie des patients de réanimation entraîne assez naturellement à vouloir s'aider de modèles expérimentaux chez l'animal et d'études cliniques chez l'homme.
Les travaux présentés ici se divisent en deux grandes parties :

- **l'étude de la modulation de la microcirculation :**
  - **la sédation chez l'homme et ses perturbations sur la microcirculation cutanée**
  - **la protéine C activée qui permettait de moduler la microcirculation et d'étudier une nouvelle hypothèse physiopathologique, l'implication de l'altération du glycocalyx sur la microcirculation dans le sepsis chez le rat**

Cela a permis l'acquisition des techniques de laser-doppler et aussi la compréhension du phénomène d'hyperhémie post-occlusive chez l'homme d'une part, et d'avancer dans la recherche de solutions pour améliorer nos techniques de microscopie intravitale, notamment l'utilisation de la dihydrorhodamine 1,2,3, et la réflexion sur la possibilité de mise en évidence du glycocalyx et de sa modulation.

- **l'apport d'arguments forts pour l'implication du potentiel de membrane mitochondrial et de sa modulation dans la survenue de dysfonctions d'organes et dans la mortalité.**

Cela a permis de développer dans notre laboratoire de nouvelles méthodologies qui étaient primordiales pour confirmer les résultats sur la fonction mitochondriale: la mesure de la pression d'oxygène par respiromètre de haute résolution, les techniques d'isolement des mitochondries et enfin la mesure directe du potentiel mitochondrial et l'étude de la tolérance au calcium de ces mitochondries.

Tout au long de ces travaux, l'idée était de garder une vision intégrée au possible des modèles et de ne pas se laisser aller à ne réfléchir que sur de l'*in vitro*. Notamment, nos résultats sur la protéine C activée ont eu au départ une impulsion clinique et sont en train de se concrétiser en retour sur une étude clinique en cours pour confirmer nos résultats expérimentaux chez l'homme, et je l'espère bien d'autres encore…

Article n°1

La question posée dans ce travail est l'impact d'une sédation habituelle en réanimation, association de benzodiazépines et de morphiniques, sur la microcirculation cutanée. Nous explorons la réponse microcirculatoire cutanée par la technique de laser-doppler à l'état de base et avec une épreuve d'hyperhémie réactive post-occlusive.

La même séquence est répétée pour chaque nouveau patient d'introduire une benzodiazépine dans un premier temps, puis un dérivé morphinique dans un deuxième temps. Ce dessin d'étude que nous avons choisi ne permet donc pas d'individualiser les effets du dérivé morphinique seul sur la microcirculation cutanée. Aux doses de sédation que nous utilisons dans l'étude, il y a une baisse significative attendue de pression artérielle, sans baisse de la fréquence cardiaque ni du débit cardiaque, sans baisse de la PtcO2 ni de la PtcCO2. Le flux basal cutané est augmenté par les benzodiazépines, interprété comme induisant une vasodilatation. L'épreuve d'hyperhémie après la perfusion de benzodiazépines montre un pic d'hyperhémie plus faible par rapport à avant. Par ailleurs la vasomotion est également amoindrie.

Nous pensons avoir étudiés les effets propres de notre sédation sur la microcirculation puisque :

- La ventilation artificielle, induisant probablement au moins indirectement des altérations microcirculatoires, était débutée depuis plus de 24 heures.

- Nous avons éliminés ou corrigés une éventuelle hypovolémie chez nos patients par un test de remplissage avant le début des explorations et après mise en route de la sédation si la pression artérielle systolique baissait en-dessous de 90 mmHg de systolique.
- Une différence interindividuelle trop importante en terme de sensibilité à la sédation puisque même si le début de la sédation était instauré à des doses fixes rapportées au poids, elle était ensuite adaptée à un score de sédation validé. Il paraît d'ailleurs important non seulement de se dire que le niveau de sédation soit adaptée pour chacun d'une part, mais aussi que la douleur ou l'anxiété n'ajoute pas des effets macro ou microcirculatoires confondants.

Pour éviter les biais liés à la mesure laser-doppler, les patients restaient dans la même position tout au long de l'étude, et l'appareil de mesure restait attaché au même endroit.

La distribution des fréquences de vasomotion avant la mise en route de la sédation est plus importante penant l'épreuve d'hyperhémie, suggérant une potentialisation de la vasomotion par l'hyperhémie. La benzodiazépine inhibe cet effet, ce qui peut être interprété comme une moins bonne réactivité si une ischémie relative apparaît. La signification de la vasomotion reste sujette à controverse. Cependant, dans les résultats nous montrons que le délai avant le pic, le pic absolu lui-même sont abaissés lors de l'épreuve d'hyperhémie suggérant aussi une altération de la réponse à l'ishémie lors de la sédation par la benzodiazépine.

L'avantage de cette technique Laser-doppler est son aspect dynamique. Même sans le prouver de façon indiscutable, nous montrons qu'une sédation « banale » en réanimation peut amener à une altération de la microcirculation qui peut par exemple augmenter le shunt microcirculatoire ou en tout cas altérer la réponse à l'ischémie de la microcirculation en situation critique.

C'est la première fois que les effets de la sédation sur la microcirculation sont étudiés sur des patients en réanimation.

Les conséquences pratiques issues de cette étude sont que :

1. Le sepsis pourraît aggraver de façon synergique ou additive ces anomalies mais cela reste à montrer

2. Si nous voulons étudier la microcirculation dans le sepsis il ne faut pas faire varier la sédation (et pas seulement comme nous aurions pu nous y attendre pour ne pas faire varier la contractilité cardiaque ou la pression artérielle moyenne) pour ne pas induire d'anomalies microcirculatoires supplémentaires.

Available online http://ccforum.com/content/10/6/R176

Research

Open Access

Microcirculatory alterations induced by sedation in intensive care patients. Effects of midazolam alone and in association with sufentanil

Veronique Lamblin, Raphael Favory, Marie Boulo and Daniel Mathieu

Service d'Urgence Respiratoire et Réanimation Médicale et de Médecine Hyperbare, Hôpital Calmette, Centre Hospitalier Universitaire, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59037 Lille Cedex, France

Corresponding author: Daniel Mathieu, dmathieu@chru-lille.fr

Received: 16 Jun 2006 Revisions requested: 5 Jul 2006 Revisions received: 29 Aug 2006 Accepted: 15 Dec 2006 Published: 15 Dec 2006

Critical Care 2006, **10**:R176 (doi:10.1186/cc5128)
This article is online at: http://ccforum.com/content/10/6/R176
© 2006 Lamblin *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction Sedation is widely used in intensive care unit (ICU) patients to limit the risk of pulmonary barotrauma and to decrease oxygen needs. However, adverse effects of sedation have not been fully evaluated; in particular, effects of benzodiazepine and opiates on microcirculation have not been extensively studied. The aim of this study was to evaluate the microcirculatory effects of a sedation protocol commonly prescribed in the ICU.

Methods Ten non-septic patients under controlled ventilation requiring sedation for therapeutic purposes were enrolled in a prospective observational study conducted in an ICU of a university hospital. Sedation was conducted in two successive steps: first, each patient received midazolam (0.1 mg/kg per hour after a bolus of 0.05 mg/kg, then adapted to reach a Ramsay score of between 3 and 5). Second, after one hour, sufentanil was added (0.1 μg/kg per hour after a bolus of 0.1 μg/kg). Arterial pressure, heart rate, cardiac output determined by transthoracic impedance, transcutaneous oxygen ($tcPO_2$) and carbon dioxide ($tcPCO_2$) pressures, and microcirculatory blood flow determined by laser Doppler flowmetry at rest and during a reactive hyperaemia challenge were measured before sedation (NS period), one hour after midazolam infusion (H period), and one hour after midazolam-sufentanil infusion (HS period).

Results Arterial pressure decreased in both sedation periods, but heart rate, cardiac output, $tcPO_2$, and $tcPCO_2$ remained unchanged. In both sedation periods, microcirculatory changes occurred with an increase in cutaneous blood flow at rest (H period: 207 ± 25 perfusion units [PU] and HS period: 205 ± 25 PU versus NS period: 150 ± 22 PU, $p < 0.05$), decreased response to ischaemia (variation of blood flow to peak: H period: 97 ± 16 PU and HS period: 73 ± 9 PU versus NS period: 141 ± 14 PU, $p < 0.05$), and attenuation of vasomotion.

Conclusion Sedation with midazolam or a combination of midazolam and sufentanil induces a deterioration of vasomotion and microvascular response to ischaemia, raising the question of whether this effect may further alter tissue perfusion when already compromised, as in septic patients.

Introduction

Because of its role in blood-tissue exchanges, the microcirculation is a fundamental element of the vascular network [1,2]. It has been long to recognise. It was only recently recognised that numerous pathologic conditions like arteriosclerosis, arterial hypertension, or diabetes alter the microcirculation, explaining, at least in part, the observed tissue hypoxia [3,4]. More recently, sepsis, a major cause of death in the intensive care unit (ICU), has been shown to induce microcirculatory dysfunction, even in its early stage and in the absence of

ΔΦ = flow variation during reactive hyperaemia (ΔΦ = Φpeak - Φrest); Φpeak = maximum cutaneous blood flow during the reactive hyperaemia peak; Φrest = cutaneous blood flow at rest; cGMP = cyclic guanosine monophosphate; CMBC = concentration of moving blood cells; CO = cardiac output; cpm = cycles per minute; H period = set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam; HR = heart rate; HS period = set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam and sufentanil; ICU = intensive care unit; LDF = laser Doppler flowmetry; MAP = mean arterial pressure; NO = nitric oxide; NS period = set of measurements obtained when the patients were non-sedated; SpO_2 = percutaneous oxygen saturation; $T_{1/2}R$ = time to half flow normalisation; $tcPCO_2$ = transcutaneous carbon dioxide pressure; $tcPO_2$ = transcutaneous oxygen pressure; Tpeak = time to reactive hyperaemia peak.

circulatory failure [5]. These microcirculatory abnormalities compromise tissue oxygenation and may contribute to organ failure development [6-9].

Less attention has been paid to microcirculatory effects of treatments used in the ICU, in particular sedation. In the ICU, patients are often sedated in order to limit the risk of pulmonary barotrauma and to decrease oxygen needs. Sedation also facilitates daily care and diagnostic or therapeutic measures, often painful for these patients. It guarantees the safety of restless patients and improves their comfort. Due to the importance of this therapy, guidelines have been issued [10-12]. However, the consequences of drugs used for sedation have not been fully evaluated; in particular, the microcirculatory effects of benzodiazepine and opiates, the more commonly used drugs for ICU sedation, have not been extensively studied. The aim of our study was to evaluate the microcirculatory effects of a commonly prescribed sedation protocol, first by using a benzodiazepine alone (midazolam) and, second, by using a combination of midazolam and an opiate (sufentanil) in ICU non-septic patients.

Materials and methods

Patients

This study was prospectively conducted during a six month period in the ICU of the Calmette University Hospital (Lille, France) after approval by our local ethics committee. Informed written consent was obtained from each patient or the closest relative. The study population included ten non-septic patients under controlled ventilation for an acute respiratory failure and requiring sedation in order to optimise mechanical ventilation. In all patients, hypovolaemia had been either previously excluded or corrected by a fluid challenge. The haemodynamic status was stable for at least two hours before the beginning of the study. Patients treated with drugs known to alter microcirculation, such as inotropic, vasopressor, or vasodilator drugs, were excluded. Other exclusion criteria were sepsis, left ventricular dysfunction, cardiac arrhythmia, peripheral arterial disease, haemoglobin level of less than 8 g/dl, renal or hepatic failure, and all pathologic conditions known to be associated with microcirculation abnormalities.

Initially, patients were under controlled ventilation without any sedation for at least 24 hours. Patients were evaluated for study enrolment when the physician in charge decided to prescribe sedation. Once the patient was included, a complete set of measurements was obtained before sedation was prescribed (NS period). Then, sedation was conducted according to our routine protocol. First, patients received midazolam (0.1 mg/kg per hour after an intravenous bolus of 0.05 mg/kg) to reach a level of sedation ranging between 3 and 5 on the Ramsay scale. If sedation was considered insufficient after 20 minutes, a new bolus of 0.025 mg was injected and the injection rate was increased by 0.05 mg/kg per hour. In case of hypotension (systolic arterial pressure of less than 90 mm Hg), injection rate was decreased by 0.025 mg/kg per hour and colloids were infused until the hypotension was corrected. After one hour of sedation and when the targeted level of sedation was reached, a second set of measurements was obtained (H period). Second, sufentanil (0.1 μg/kg per hour after a bolus of 0.1 μg/kg) was added to midazolam (0.1 mg/kg per hour). If sedation was insufficient after 20 minutes, a new bolus of 0.05 μg was injected and the injection rate increased by 0.05 μg/kg per hour. In case of hypotension or bradycardia, the injection rate was decreased by 0.05 μg/kg per hour and colloid infusion (25 ml/minute) was started. The targeted level of sedation and recordings were the same as for the preceding step (HS period).

Measurements

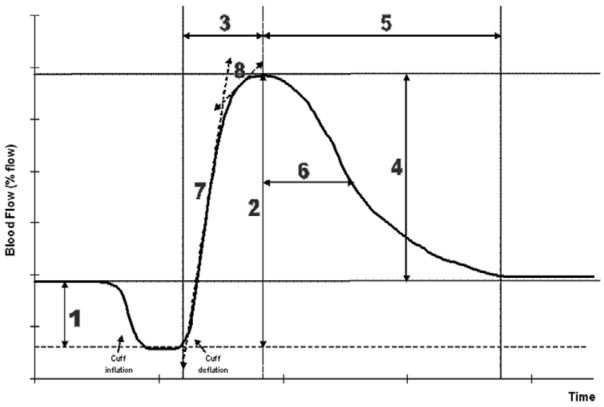
A complete set of measurements included heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), percutaneous oxygen saturation (SpO_2), cardiac output (CO), transcutaneous oxygen ($tcPO_2$) and carbon dioxide ($tcPCO_2$) pressures, and cutaneous blood flow at rest (Φrest) and during hyperaemia. CO was measured by transthoracic impedance (Bomed NCCOM 3; Bomed, Irvine, CA, USA) using a lateral spot electrode configuration and incorporating the Sramek-Bernstein equation [13]. The mean of five consecutive determinations of CO was recorded as CO. A satisfactory agreement between this non-invasive method and thermodilution had been observed in critically ill patients under mechanical ventilation, and reproducibility is comparable to reference techniques [14,15]. $tcPO_2$ and $tcPCO_2$ were continuously recorded (Kontron Instruments, Basel, Switzerland).

Cutaneous blood flow was measured with a laser Doppler flowmeter probe and device (Periflux PF4; Perimed AB, Stockholm, Sweden). This technique allows real-time and continuous monitoring suitable for cutaneous microcirculation inquiries [16,17]. Laser Doppler flowmetry (LDF) had been previously validated in animals and humans by the thermal clearance technique, *in vivo* microscopy, and plethysmography [18,19]. Different signals are available: velocity, concentration of moving blood cells (CMBC), and their product, flow. Cutaneous blood flow was measured at rest and during reactive hyperaemia, and values were expressed in perfusion units. The laser Doppler signal was continuously registered on a personal computer. The gain was adjusted to 1, the cutoff frequency to 12 Hz, and the time constant to 0.2 seconds. A constant back-scattered light of at least 30% of the emitted light indicates an adequate contact of the optical probe with the tissue surface. Before each patient was studied, a calibration based on the random Brownian motion of small scatterers in an emulsion (Periflux motility standard; Perimed AB) was performed. Φrest, velocity, and CMBC were taken as the means of a five minute stable LDF recording [20].

Reactive hyperaemia was produced by an arrest of forearm blood flow with a pneumatic cuff inflated to a suprasystolic

Available online http://ccforum.com/content/10/6/R176

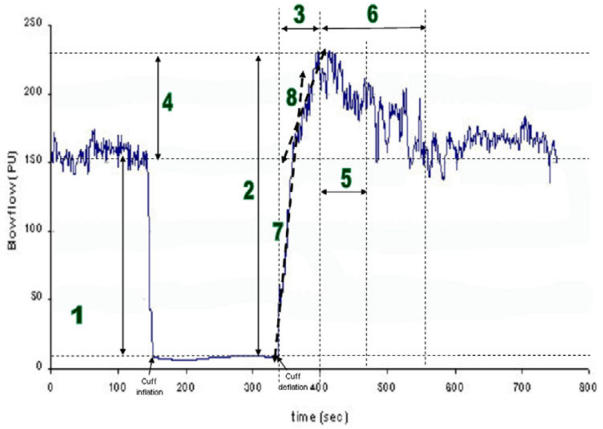
Figure 1



Schematic representation of reactive hyperaemia and measurements realised from laser Doppler recording. 1: Mean blood flow at rest (Φrest). 2: Peak flow (Φpeak). 3: Time to peak. 4: ΔΦ = Φpeak - Φrest. 5: Time to flow normalisation. 6: Time to half flow normalisation. 7: First upward slope calculated for the first 3 seconds. 8: Second upward slope calculated for the second half.

pressure of 200 mm Hg for three minutes. The signal obtained during this complete arterial occlusion is flux-independent and is taken as the biological zero for blood flow measurements before and during the subsequent reactive hyperaemia manoeuvre. On completion of the ischaemic period, the occluding cuff was rapidly deflated to zero. Peak flow was defined as the highest flow signal during the postocclusive phase. Reactive hyperaemia is considered to test organ maximal ability to increase flow on demand, when demand has been maximally stimulated by a zero flow. This manoeuvre is widely used as a vascular reactivity test [21,22]. The following

Figure 2



Example of a laser Doppler recording of blood flow during reactive hyperaemia in a patient sedated with midazolam. 1: Mean blood flow at rest (Φrest). 2: Peak flow (Φpeak). 3: Time to peak. 4: ΔΦ = Φpeak - Φrest. 5: Time to flow normalisation. 6: Time to half flow normalisation. 7: First upward slope calculated for the first three seconds. 8: Second upward slope calculated for the second half. PU, perfusion units.

were measured on LDF recordings: maximum flow during the reactive hyperaemia peak (Φpeak), flow variation (ΔΦ = Φpeak - Φrest), time to peak (Tpeak), time to half flow normalisation ($T_{1/2}$ R), and time to flow normalisation. On each curve of reactive hyperaemia, the slope of the best-fit line traced using linear regression associated with the upward portion of hyperaemia peak (first three seconds: slope 1; second half: slope 2) was determined. All of these parameters have been shown to be reproducible [23] and are represented in Figure 1. An example of an LDF recording is shown in Figure 2.

During the whole study period, patients remained in a constant supine position in comfortable environmental conditions that were maintained without change. The $tcPO_2$ and $tcPCO_2$ probe was placed on the forearm skin distal to the cuff. The LDF probe remained placed on the same location (left mean finger pad) without any displacement.

Vasomotion

The small arteries of the microcirculation present rhythmic and spontaneous variations of their diameter called, by convention, vasomotion and characterised by a frequency and amplitude [24]. This low-frequency rhythm is present in the cutaneous microcirculation and can be studied with LDF. According to the classification described by Colantuoni and colleagues [25], frequencies of vasomotion ranging between 0 and 3.5 cycles per minute (cpm) correspond to the A1 medium arteries, those ranging between 2.5 and 4.7 cpm to the A2 small arteries, those ranging between 4 and 7.6 cpm to the A3 small arteries, and those ranging between 7.6 and 12 cpm to the final arteries, A4.

Analysis by Fast Fourier Transformation allows the determination of the spectra of frequencies and amplitudes contained in the LDF signal for the frequencies ranging between 0 and 12 cpm at rest and during reactive hyperaemia (PSW Software; Perimed AB). At each frequency, an amplitude, defined as the importance of the studied frequency in the portion of LDF recording analysed, is associated. In each period and for each frequency (1 to 12 cpm), the median of the vasomotion amplitudes was determined.

Statistical analysis

In our study, each patient acted as his or her own control. All data are expressed as means ± standard error of the mean except for the frequencies of vasomotion expressed as a median. Repeated measures analysis of variance was used to compare NS, H, and HS periods. When significant, intergroup comparisons were made by Tukey's multiple comparison tests. Vasomotion frequency spectra were compared by a Kolmogorov-Smirnov test, according to sedation type, and then a non-parametric repeated measures analysis of variance (Friedman test) was used to compare NS, H, and HS periods for each vasomotion frequency studied (0 to 12 cpm). Significance was accepted at $p < 0.05$.

Table 1

General characteristics of study population

Patient	Age (years)	Gender	Weight (kg)	Temperature (°C)	Respiratory failure	SAPS II	Outcome
1	74	Male	70	36.9	COPD	34	Alive
2	67	Female	60	37.2	COPD	24	Alive
3	66	Male	84	37.1	Postoperative	35	Alive
4	77	Male	70	36.8	Postoperative	37	Dead
5	19	Female	80	36.8	Asthma	44	Alive
6	50	Female	70	37.4	COPD, obesity	36	Alive
7	76	Female	87	36.8	SAS, obesity	86	Alive
8	73	Male	73	36.9	COPD	38	Alive
9	57	Male	70	37.5	COPD	39	Alive
10	75	Male	80	37.0	COPD	47	Dead

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SAS, sleep apnoea syndrome.

Results

Ten patients were included in our study. General characteristics are summarised in Table 1. When the H-period data were collected, 26 ± 13 mg of midazolam had been infused and the Ramsay score obtained was 4 ± 1. When the HS-period data were collected, 41 ± 20 mg of midazolam had been infused during the two hour infusion and 55 ± 36 μg of sufentanil was added the second hour. The Ramsay score obtained was 5 ± 1.

Pattern of resting parameters

MAP decreased significantly during the sedation periods (H and HS) compared to the NS period with no difference between H and HS periods. HR, CO, SpO_2, $tcPO_2$, and $tcPCO_2$ remained unchanged in all periods. Mean blood flow at rest (Φrest) increased during the two sedation periods compared to the NS period. CMBC remained unchanged by sedation, whereas red blood cell velocity increased during H and HS periods compared to the NS period (Table 2).

Vasomotion frequency spectra obtained in each sedation period are represented in Figure 3. Distribution of vasomotion frequencies was significantly different during the H period compared to NS and HS periods. There was no difference

Table 2

Resting parameters

	NS period	H period	HS period
MAP (mm Hg)	94 ± 3	84 ± 4[a]	81 ± 4[a]
HR (beats per minute)	83 ± 6	81 ± 5	78 ± 5
CO (litres/minute)	5.38 ± 0.82	5.27 ± 0.82	5.33 ± 1.08
SpO_2 (percentage)	96.4 ± 0.5	96.7 ± 0.5	96.1 ± 0.5
$tcPO_2$ (mm Hg)	67 ± 6	61 ± 6	61 ± 7
$tcPCO_2$ (mm Hg)	45 ± 2	44 ± 4	42 ± 4
Φrest (PU)	150 ± 22	207 ± 25[a]	205 ± 25[a]
CMBC (CU)	145 ± 15	152 ± 16	155 ± 15
Velocity (VU)	1.06 ± 0.11	1.39 ± 0.15[a]	1.37 ± 0.79[a]

[a]$p < 0.05$ versus NS period. Φrest, mean blood flow at rest; CMBC, concentration of moving blood cells in concentration units (CU); CO, cardiac output; H period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam; HR, heart rate; HS period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam and sufentanil; MAP, mean arterial pressure; NS period, set of measurements obtained when the patients were non-sedated; PU, perfusion units; SpO_2, percutaneous oxygen saturation; $tcPCO_2$, transcutaneous carbon dioxide pressure; $tcPO_2$, transcutaneous oxygen pressure; velocity expressed in velocity units (VU), Φrest (perfusion units)/CMBC.

Available online http://ccforum.com/content/10/6/R176

between the NS and HS periods. Midazolam significantly decreased vasomotion, and sufentanil restored the vasomotion. Midazolam acted especially on the low-frequency vasomotion, which corresponds to the A1 and A2 small arteries (Figure 3).

Reactive hyperaemia

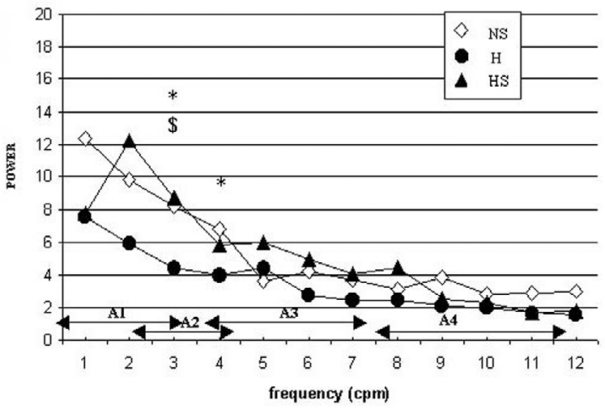
Peak blood flow (Φpeak) remained unchanged during sedation periods versus the NS period. ΔΦ decreased significantly during H and HS periods versus the NS period, whereas no significant difference existed between sedation periods. Slope 1 associated with the initial upward portion of hyperaemia peak was not changed by midazolam but increased when sufentanil was added to midazolam. Slope 2 associated with the second upward portion of peak was not influenced by sedation (Table 3).

In the NS period, vasomotion wave amplitudes were higher during reactive hyperaemia than at rest. This reinforcement of vasomotion by reactive hyperaemia has been described in the literature and proves that the microcirculation of our patients reacted normally [22]. In vasomotion frequency analysis, this phenomenon was observed mainly in the low frequencies (1 to 3 cpm) and thus concerned mainly the A1 small arteries. In contrast, during sedation periods, this inductive role of reactive hyperaemia was not observed. Vasomotion was depressed and this effect predominated in A1 small arteries (Figures 3 and 4).

Discussion

Sedation is widely used in ICU patients but its potentially deleterious effects, in particular on the microvascular bed, have not been precisely evaluated. In this study, we found that sedation using midazolam or a combination of midazolam and sufentanil induces microcirculatory changes with increased cutaneous blood flow, decreased response to ischaemia, and attenuation of vasomotion.

Figure 3



Distribution of vasomotion frequencies at rest. Kolmogorov-Smirnov test: $p < 0.05$ NS and HS periods versus H period. Friedman test: $^{*}p < 0.05$ NS period versus H period, $^{\$}p < 0.05$ HS period versus H period. cpm, cycles per minute; H period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam; HS period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam and sufentanil; NS period, set of measurements obtained when the patients were non-sedated.

Effects of sedation on cutaneous microcirculation at rest

Microcirculation and midazolam

Sedation with midazolam induces a significant decrease of MAP. Cardiovascular effects of benzodiazepines are well known in anaesthesia [26,27]. However, with the subanaesthesic dose of benzodiazepine recommended for ICU sedation, MAP and HR decrease only slightly [28], as we have noted in our study.

Mean cutaneous blood flow increased after one hour of sedation by midazolam. In parallel to blood flow, the red blood cell velocity increased, whereas CMBC remained stable. These data are in favour of a cutaneous vasodilation induced by

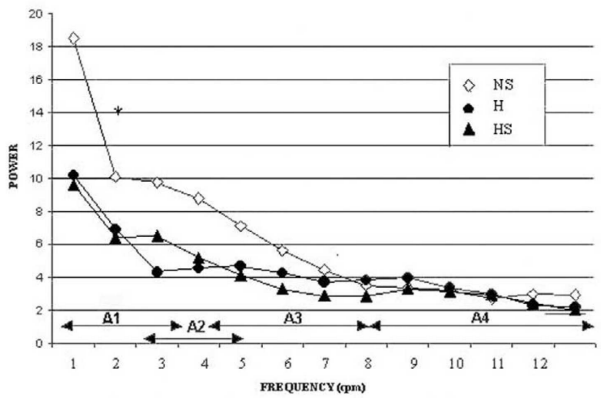
Table 3

Changes in Doppler measurements during reactive hyperaemia according to sedation types

	NS period	H period	HS period
Φpeak (PU)	292 ± 31	304 ± 28	274 ± 25
ΔΦ (PU)	141 ± 14	97 ± 16[a]	73 ± 9[a]
TP (seconds)	23.5 ± 4.3	43.8 ± 11.5	24.2 ± 8.2
$T_{1/2}$ R (seconds)	38.8 ± 13.7	22.9 ± 3.4	23.8 ± 5.5
TR (seconds)	170.1 ± 40.5	117.2 ± 3.4	85.1 ± 14.9
Slope 1 (PU/second)	53.6 ± 13.3	51.5 ± 8.8	74.1 ± 10.9[a,b]
Slope 2 (PU/second)	10.8 ± 3.7	8.2 ± 3.0	8.7 ± 0.7

[a]$p < 0.05$ versus NS period; [b]$p < 0.05$ versus H period. ΔΦ, Φpeak - Φrest; Φpeak, maximal blood flow during reactive hyperaemia; H period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam; HS period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam and sufentanil; NS period, set of measurements obtained when the patients were non-sedated; PU, perfusion units; $T_{1/2}$ R, time to half flow normalisation; TP, time to peak; TR, time to flow normalisation.

Figure 4



Distribution of vasomotion frequencies during reactive hyperaemia according to sedation. Kolmogorov-Smirnov test: $*p < 0.05$ NS period versus H and HS periods. cpm, cycles per minute; H period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam; HS period, set of measurements obtained when the patients were sedated by midazolam and sufentanil; NS period, set of measurements obtained when the patients were non-sedated.

midazolam and are in agreement with the literature [29]. Studies of cutaneous and subcutaneous blood flows after injection of benzodiazepine show an increase in the surface cutaneous thermal clearance as well as a stability of the deep thermal clearance, corresponding to an increase in cutaneous blood flow with no deterioration of subcutaneous blood flow [30,31]. In another study, LDF also reveals an increase in cutaneous blood flow among anaesthetised and hypothermic patients compared to control subjects [32].

The increase in cutaneous blood flow may be explained by the direct vasodilator effect of benzodiazepines [29]. Midazolam attenuates the smooth muscle contraction induced by norepinephrine, acting by an inhibition of Ca^{2+} influx occurring through voltage-operated Ca^{2+} channels and through agonist-mediated Ca^{2+} channels and by an inhibition of Ca^{2+} release from intracellular storage sites (sarcoplasmic reticulum) [33]. Endothelium-dependent mechanisms also take part in the vasodilation produced by midazolam through the release of nitric oxide (NO) from vascular endothelium [34].

Microcirculation and the combination of midazolam and sufentanil

In our study, the combination of midazolam and sufentanil worsened hypotension (only slightly) and bradycardia but did not change CO. Φrest was higher during the HS period than during the NS period but was not different from that observed during the H period. Contradictory results concerning the effects of sufentanil on vascular tone have been described in the literature. Sufentanil has been shown to decrease peripheral vascular resistances through a direct vascular effect [35]. Karasawa and colleagues [36] showed this effect to be due to an endothelium-independent vasorelaxation mediated by both an alpha-receptor blockage and a direct effect on smooth muscle. In addition, Stefano and colleagues [37] reported that endothelial cells contain opiate receptors called mu3 which are coupled to NO release and vasodilation. On the other hand, a direct contractile effect on vascular smooth muscle has also been described [38]. As shown by Brookes and colleagues [39], the discrepancy between these two studies may be explained by differences in doses. In our study, sufentanil dose may have been insufficient to induce additional microcirculatory disturbances.

Effects of sedation on cutaneous microcirculation response to ischaemia

Reactive hyperaemia

Reactive hyperaemia is a well-established and widely used challenge to test microcirculation reactivity. This method has been largely validated and is reproducible in humans [40,41]. It corresponds to an increase in local blood flow, secondary to a transient ischaemia, and is thought to exactly reflect the circulatory deficit that has occurred during the vascular occlusion.

Reactive hyperaemia is the result of the combination of several phenomena divided into a myogenic phase followed by a metabolic phase. The myogenic phase corresponds to the changes of arteriolar diameter in response to pressure modifications and is thought to be reflected by the initial upward portion (slope 1) of the hyperaemia peak [42]. At the time of the metabolic phase thought to be reflected by the second part of the upward portion (slope 2), the arteriolar vasodilation is the result of factors acting directly on the vascular smooth muscle or via the endothelium [42,43]. Engelke and colleagues [44] showed that prostaglandins, released from the vascular endothelium, are important determinants of the hyperaemia peak, in contrast to NO, which takes part only in the maintenance of the vasodilation after the peak [45].

Reactive hyperaemia and midazolam

In our study, midazolam did not influence the blood flow at hyperaemia peak. On the other hand, ΔΦ (Φpeak - Φrest) was decreased by 30% compared to the NS period. Peak blood flow represents the maximum microcirculatory blood flow obtainable by vasodilation. This explains the stability of Φpeak and the decrease of ΔΦ during reactive hyperaemia in patients during the H period, in whom an increased Φrest existed before the reactive hyperaemia manoeuvre. Time to peak tended to increase. All of these results show that midazolam induced a limitation of the vascular response to ischaemia.

Reactive hyperaemia and the combination of midazolam and sufentanil

During reactive hyperaemia, addition of sufentanil to midazolam did not change peak blood flow compared to NS and H periods. On the other hand, ΔΦ decreased by 50% during the HS period compared to the NS period but did not differ from

Available online http://ccforum.com/content/10/6/R176

the H period. Time to peak decreased during the HS period compared to the H period without reaching the threshold of significance.

The slope 1 was significantly increased compared to the H period, evoking modification of the myogenic phase of reactive hyperaemia. During the HS period, small arteries seemed to vasodilate more easily and more quickly than during the H period. Sufentanil could induce a decrease in the smooth vascular tonicity by acting directly on the vascular smooth muscle and making vasorelaxation easier. These results are in agreement with those of Karasawa and colleagues [36], who found that fentanyl induces vasodilation via a direct action on muscular smooth cell and by locking alpha-adrenergic receptors. However, because in our study these changes were observed during the injection of a combination of midazolam and sufentanil, we cannot determine whether sufentanil was, by itself, responsible for the decrease in vascular tonicity or only reinforced an effect started under midazolam.

Effects of sedation on vasomotion

Blood flow in the microcirculation is not continuous but is subject to cyclic variations in which periods of high blood flow alternate with periods of no flow. This phenomenon has been called vasomotion and is due to changes in lumen diameters which result from periodic activity of muscle cells in the microvessel wall governed by oscillation of intracellular calcium concentration [46].

Vasomotion has been observed since the inception of microvascular studies by intravital microscopy [47,48]. Later, when LDF appeared, the oscillatory flow patterns observed were related to the vasomotion activity of the microcirculation. Subsequently, it was shown that frequency analysis of LDF recordings was able to discriminate between the types of vessels from which the signal originates and that low-frequency flow oscillations were directly related to vasomotion of the arterioles [25,49].

Vasomotion and sedation

In our study, we observed a significant reduction in the importance of cutaneous vasomotion at rest and during reactive hyperaemia in the group sedated with midazolam. The combination of midazolam and sufentanil seemed to restore cutaneous vasomotion to its resting level. Anaesthetic drugs have long been recognised to alter vasomotion [50,51].

Decrease of vasomotion observed during midazolam infusion is probably due to the benzodiazepine effects on intracellular calcium concentration: inhibition of Ca^{2+} influx and decrease of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum [33]. An explanation for the restoration of vasomotion when sufentanil is added to midazolam is less evident. Stephano and colleagues [37] have shown that opiates induce NO release through endothelial mu3 receptors. We hypothesise that this increase in NO could elevate cyclic guanosine monophosphate (cGMP) concentration in smooth muscle cells, thereby increasing the cGMP-dependent Ca^{2+}-activated chloride channel, which has been shown to be responsible for coupling the Ca^{2+} oscillations generated by the sarcoplasmic reticulum to the membrane current that synchronises individual cells [52,53].

In the NS period, we found vasomotion frequency distributions to be more important during reactive hyperaemia than at rest, evidence of a potentiation of vasomotion by hyperaemia. During midazolam infusion, an inhibition of this increase of vasomotion induced by reactive hyperaemia was noted. Frequency analysis of the LDF recordings showed that the action of midazolam on vasomotion prevailed on the A1 small arteries (frequency of between 1 and 3 cpm). On the contrary, Colantuoni and colleagues [25] found that the inhibition of vasomotion by anaesthesia concerns vessels of all orders. The discrepancy with our study may be explained by technical reasons. In our study, 70% of the LDF signal came from the largest arterioles, A1 and A2, and only 30% of the signal from the smallest arteries, A3 and A4 (Figures 3 and 4). Consequently, it may have been statistically easier to highlight an effect of sedation on the A1 small arteries even if sedation deteriorates the vasomotion in all four orders of small arteries.

Our study suffers from some limitations. First, the small number of patients may have hidden some true variations. Second, the study design did not include a randomisation between the two steps. So, a carry-over effect may interfere when studying the combination of midazolam and sufentanil. In accordance with the aim of our study, we designed our sedation protocol following widely accepted guidelines in order to be closer to routine clinical practice. Doses of sufentanil used were perhaps not sufficient to induce an additional effect on cutaneous microcirculation. In clinical practice, the amounts of opiates used are often higher than those recommended. So, sufentanil's own effects may have been minimised.

Third, we chose the LDF technique because it is non-invasive and easy to use in an ICU setting. Numerous techniques have been proposed to explore the microcirculation, none of which is without critics. Recently, a new technique, orthogonal polarisation spectral imaging, has been used in the ICU. It has several advantages, in particular in separating respective changes in small arteries, capillaries, and venules [8]. However, it gives semi-quantitative measurements, suffers from an intra/interobserver variability of 5% to 10%, and is less suitable for monitoring short-term microcirculatory blood flow change as during recruitment manoeuvres. LDF is more suitable for monitoring such rapid microcirculatory blood flow changes but raises problems of calibration, artifact related to patient movements, inability to separate respective changes between all the vessels included in the investigated volume, and inter-individual flow variations [54]. In our series, we noted great interindividual variations of blood flows at rest and during reactive

hyperaemia. However, for the same patient, the signal is reproducible provided that the position of probe and conditions of measurement remain identical (haemodynamic, temperature) [23,55]. Cutaneous blood flow varies according to the area measured. Indeed, in the upper limb, the palms of the hand and finger pads are better vascularised than the forearm or the dorsum of the hand. We chose the pad of the mean finger as the site of recording because this zone is highly vascularised and, consequently, flow is more easily detectable by LDF [56]. Lastly, we studied the effects of sedation on cutaneous microcirculation. Even if skin preparations have often been used as a model to study microcirculation, extension of our results to other microcirculations may be made only with caution. Further studies have to be carried out to determine whether microcirculation in other organs reacts in the same way.

Conclusion

Our study is one of the first to examine the effects of a sedation regimen commonly used in the ICU on cutaneous microcirculation. Benzodiazepine induces an increase in cutaneous blood flow secondary to vasodilation, a decrease in reactive hyperaemia, and alterations of vasomotion. Addition of sufentanil does not substantially modify the results obtained.

Clinical studies have clearly established that alterations of normal microcirculatory control mechanisms may compromise the tissue nutrient blood flow and may contribute to the development of organ failure in septic patients [9,57,58]. Our study raises the question of whether sedation with benzodiazepine or a combination of benzodiazepine and sufentanil by deteriorating vasomotion and vascular reactivity to ischaemia may further alter tissue perfusion when already compromised, as in septic patients.

Key messages

- Sedation with midazolam alone or in association with sufentanil induces a deterioration of vasomotion and microvascular response to ischaemia. This raises the question of whether sedation may further alter tissue perfusion when already compromised, as in septic patients.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VL conceived the protocol, participated in its design, carried out bedside measurements and documentation, and drafted the manuscript. MB and RF conceived the protocol and helped to interpret the data. DM conceived the protocol, participated in its design and coordination, and helped to interpret the data and to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The Centre Hospitalier Universitaire de Lille and the Universite de Lille provided funding for this study.

References

1. Schmid-Schonbein G, Ross J: **Structure-function relations in the peripheral circulation.** In *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice* Edited by: West JB. Baltimore: Williams-Wilkins; 1990:118-137.
2. Engelson ET, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW: **The microvasculature in skeletal muscle. II. Arteriolar network anatomy in normotensive and spontaneously hypertensive rats.** *Microvasc Res* 1986, **31:**356-374.
3. Hauser CJ, Shoemaker WC: **Use of a transcutaneous PO_2 regional perfusion index to quantify tissue perfusion in peripheral vascular disease.** *Ann Surg* 1983, **197:**337-343.
4. Cesarone MR, Laurola G, Belcaro GV: **Microcirculation in systemic hypertension.** *Angiology* 1992, **43:**899-903.
5. Neviere R, Mathieu D, Chagnon JL, Lebleu N, Millien JP, Wattel F: **Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153:**191-195.
6. Lush CW, Kvietys PR: **Microvascular dysfunction in sepsis.** *Microcirculation* 2000, **7:**83-101.
7. Sair M, Etherington PJ, Peter Winlove C, Evans TW: **Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis.** *Crit Care Med* 2001, **29:**1343-1349.
8. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL: **Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166:**98-104.
9. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL: **Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock.** *Crit Care Med* 2004, **32:**1825-1831.
10. Shapiro BA, Warren J, Egol AB, Greenbaum DM, Jacobi J, Nasraway SA, Schein RM, Spevetz A, Stone JR: **Practice parameters for intravenous analgesia and sedation for adults patients in the intensive care unit: an executive summary. Society of Critical Care Medicine.** *Crit Care Med* 1995, **23:**1596-1600.
11. Shafer A: **Complications of sedation with midazolam in the intensive care unit and a comparison with other sedative regimens.** *Crit Care Med* 1998, **26:**947-956.
12. Shelly MP, Sultan MA, Bodenham A, Park GR: **Midazolam infusions in critically ill patients.** *Eur J Anaesthesiol* 1991, **8:**21-27.
13. Huang KC, Stoddard M, Tsueda KA, Heine MF, Thomas MH, White M, Wieman TJ: **Stroke volume measurements by electrical bioimpedance and echocardiography in healthy volunteers.** *Crit Care Med* 1990, **18:**1274-1278.
14. Shoemaker WC, Belzberg H, Wo CC, Milzman DP, Pasquale MD, Baga L, Fuss MA, Fulda GJ, Yarbrough K, Van DeWater JP, *et al.*: **Multicenter study of non invasive monitoring systems as alternatives to invasive monitoring of acutely ill emergency patients.** *Chest* 1998, **114:**1643-1652.
15. Salandin V, Zussa C, Risica G, Michielon P, Paccagnella A, Cipolotti G, Simini G: **Comparison of cardiac output estimation by thoracic electrical bioimpedance, thermodilution and Fick methods.** *Crit Care Med* 1988, **16:**1157-1158.
16. Bonner RF, Clem TR, Bowen PD: **Laser Doppler continuous real-time monitor of pulsatile and mean blood flow in tissue microcirculation.** In *Scattering Techniques Applied to Supramolecular and Non-Equilibrium Systems* Edited by: Chen SH, Chu B, Nossal R. New York: Plenum Press; 1981:685-701.
17. Bonner R, Nossal R: **Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue.** *Appl Optics* 1981, **20:**2097-2107.
18. Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G: **Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser Doppler flowmeter and heat thermal clearance method.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1986, **5:**73-83.
19. Fagrell B: **Advances in microcirculation network evaluation: an update.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1995, **15(suppl 1):**34-40.
20. Bircher A, De Boer EM, Agner T, Wahlberg JE, Serup J: **Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis.** *Contact Dermatitis* 1994, **30:**65-72.

Available online http://ccforum.com/content/10/6/R176

21. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ: **Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool?** *Chest* 2005, **127:**2254-2263.
22. Pyke KE, Tschakovsky ME: **The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function.** *J Physiol* 2005, **568:**357-369.
23. Yvonne-Tee GB, Rasool AH, Halim AS, Rahman AR: **Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005, **52:**286-292.
24. Intaglietta M: **Arteriolar vasomotion: implication for tissue ischemia.** *Blood Vessels* 1991, **28(suppl 1):**1-7.
25. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M: **Quantification of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation.** *Am J Physiol* 1984, **246:**H508-H517.
26. Reves JG, Fragen RJ, Vinik R, Greenblatt DJ: **Midazolam: pharmacology and uses.** *Anesthesiology* 1985, **62:**310-324.
27. Marty J, Gauzit R, Lefevre P, Coudrec E, Farinotti R, Henzel C, Desmonts JM: **Effects of diazepam and midazolam on baroreflex control of heart rate and on sympathetic activity in humans.** *Anesth Analg* 1986, **65:**113-119.
28. Ronan KP, Gallager TJ, George B, Hamby B: **Comparison of propofol and midazolam for sedation in intensive care unit patients.** *Crit Care Med* 1995, **23:**286-293.
29. West JM, Estrada S, Heerdt M: **Sudden hypotension associated with midazolam and sufentanil.** *Anesth Analg* 1987, **66:**693-694.
30. Saumet JL, Leftheriotis G, Dubost J, Kalfon J, Baurillon V, Freidel M: **Cutaneous and subcutaneous blood flow during general anaesthesia.** *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988, **57:**601-605.
31. Saumet JL, Leftheriotis G, Dittmar A, Delhomme G, Degoute CS: **Skin blood flow changes in anaesthetized humans: comparison between skin thermal clearance and finger pulse amplitude measurement.** *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1986, **54:**574-577.
32. Micheels J, Alsbjorn B, Sorensen B: **Laser Doppler flowmetry a new non-invasive measurement of microcirculation in intensive care?** *Resuscitation* 1984, **12:**31-39.
33. Yamaguchi S, Kanmura Y, Yoshimura N: **Effects of midazolam on contractions in smooth muscle of rabbit mesenteric artery.** *Anesth Analg* 1997, **84:**199-205.
34. Chang KSK, Feng MG, Davis RF: **Midazolam produces vasodilatation by mixed endothelium-dependent and independent mechanisms.** *Anesth Analg* 1994, **78:**710-717.
35. White DA, Reitan JA, Kien ND, Thorup SJ: **Decrease in vascular resistance in the isolated canine hindlimb after graded doses of alfentanil, fentanyl, and sufentanil.** *Anesth Analg* 1990, **71:**29-34.
36. Karasawa F, Iwanov V, Moulds RF: **Sufentanil and alfentanil cause vasorelaxation by mechanisms independents of endothelium.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993, **20:**705-711.
37. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS: **Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation.** *J Biol Chem* 1995, **270:**30290-30293.
38. Parra L, Perez-Vizcaino F, Alsasua A, Martin MI, Tamargo J: **Mu- and delta-opioid receptor-mediated contractile effects on rat aortic vascular smooth muscle.** *Eur J Pharmacol* 1995, **277:**99-105.
39. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS: **The dose-dependent effects of fentanyl on rat skeletal muscle microcirculation *in vivo*.** *Anesth Analg* 2003, **96:**456-462.
40. Maurel A, Hamon P, Maquin-Mavier I, Lagrue G: **Laser-doppler study of microcirculatory cutaneous bloodflow. A study about 100 human volunteers.** *Presse Med* 1991, **20:**1205-1209.
41. Östergren J, Fagrell B: **Skin capillary blood cell velocity in man. Characteristics and reproducibility of reactive hyperemia response.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1986, **5:**37-51.
42. Koller A, Kaley G: **Role of endothelium in reactive dilation of skeletal muscle arterioles.** *Am J Physiol* 1990, **259:**H1313-H1316.
43. Koller A, Kaley G: **Endothelium regulates skeletal muscle microcirculation by blood flow velocity-sensing mechanism.** *Am J Physiol* 1990, **258:**H916-H920.
44. Engelke KA, Halliwill JR, Proctor DN, Dietz N, Joyner MJ: **Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in the human forearm.** *J Appl Physiol* 1996, **81:**1807-1814.
45. Meredith IT, Currie KE, Anderson TJ, Roddy MA, Ganz P, Creager MA: **Postischemic vasodilatation in human forearm is dependent on endothelium-derived nitric oxide.** *Am J Physiol* 1996, **270:**H1435-H1440.
46. Brekke JF, Jackson WF, Segal SS: **Arteriolar smooth muscle $Ca2^+$ dynamics during blood flow control in hamster cheek pouch.** *J Appl Physiol* 2006, **101:**307-315.
47. Clark ER, Clark EL: **Observations on living preformed blood vessels as seen in a transparent chamber implanted in the rabbits ear.** *Am J Anat* 1932, **49:**441-474.
48. Nicoll PA, Webb RL: **Vascular patterns and active vasomotion as determiners of flow through minute vessels.** *Angiology* 1955, **6:**291-303.
49. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M: **Microvascular vascular vasomotion: origin of laser Doppler flux motion.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1994, **14:**151-158.
50. Faber JE, Harris PD, Wiegman DL: **Anaesthetic depression of microcirculation, central hemodynamics, and respiration in decerebrate rats.** *Am J Physiol* 1982, **243:**H837-H843.
51. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M: **Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1984, **3:**13-28.
52. Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjaer C, Nilsson H: **Hypothesis for the initiation of vasomotion.** *Circ Res* 2001, **88:**810-815.
53. Rahman A, Matchkov V, Nilsson H, Aalkjaer C: **Effects of cGMP on coordination of vascular smooth muscle cells of rat mesenteric small arteries.** *J Vasc Res* 2005, **42:**301-311.
54. Bollinger A, Hoffmann U, Franzeck UK: **Evaluation of flux motion in man by the laser Doppler technique.** *Blood Vessels* 1991, **28:**21-26.
55. Hoffmann U, Uckay I, Fisher M, Wen S, Franzeck UK, Bollinger A: **Simultaneous assessment of muscle and skin blood fluxes with laser Doppler technique.** *Int J Microcirc Clin Exp* 1995, **15:**53-59.
56. Wilkin JK: **Periodic cutaneous blood flow during post occlusive reactive hyperemia.** *Am J Physiol* 1986, **250:**H765-H768.
57. Wattel F, Mathieu D, Nevière R, Bocquillon N: **Role of microcirculation in multiorgan failure of infectious origin.** *Bull Acad Natl Med* 2000, **184:**1609-1619.
58. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ: **Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenic basis for therapy?** *J Pathol* 2000, **190:**373-386.

Article n°2

Dans un modèle bien connu d'injection de LPS chez le rat, nous avons étudiés les effets macrocirculatoires, pression artérielle et fonction cardiaque avec un modèle de cœur isolé-perfusé de type Langendorff et la microcirculation intestinale par vidéomicroscopie intravitale de la protéine C activée.

L'hypothèse formulée est que ce traitement qui a pour tropisme l'endothélium a des actions bénéfiques macro et microcirculatoires en agissant sur l'inflammation et diminue les défaillances d'organes. Nous montrons que la protéine C activée, donnée en prétraitement, prévient la baisse de pression artérielle dès l'injection de LPS, la dysfonction ventriculaire gauche et les anomalies microcirculatoires intestinales au temps 4 heures, moment où nous avons déjà le maximum d'effets dans ces organes dans ce modèle. D'autre part, sur le plan biologique, la protéine C diminue le taux de TNF-α, de nitrates/nitrites plasmatiques, de MIF (macrophage inhibiting factor), d'activité myéloperoxydase (MPO) leucocytaire intestinale et cardiaque. Pris ensemble, ces résultats montrent une amélioration de la fonction microcirculatoire, macrocirculatoire et cardiaque. Il est bien sûr impossible d'affirmer que toutes ces anomalies sont prévenues parce que la protéine C activée a des effets spécifiques directs sur tel ou tel organe, par exemple par le biais d'une diminution de la perméabilité capillaire ou si la protéine C agit uniquement en amont de la cascade proinflammatoire, avec le TNF-α et la synthèse de NO par l'iNOS et a donc des effets sur la pression artérielle (NO, ROS), le cœur (NO, ROS, TNF-α, infiltration leucocytaire) microcirculation (NO, ROS, leucocyte).

Intensive Care Med (2006) 32:899–905
DOI 10.1007/s00134-006-0166-x

EXPERIMENTAL

Raphael Favory
Steve Lancel
Xavier Maréchal
Stéphanie Tissier
Remi Neviere

Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats

Received: 8 November 2005
Accepted: 16 March 2006
Published online: 7 April 2006
© Springer-Verlag 2006

This research was funded in part by Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Ind., USA, in the form of a research grant totaling €27,000 and the provision of rat recombinant protein C (drotecogin alpha).

R. Favory · S. Lancel · X. Maréchal · S. Tissier · R. Neviere (✉)
EA 2689, Université de Lille 2,
Faculté de Médecine Lille,
Lille, France
e-mail: rneviere@univ-lille2.fr
Tel.: +33-3-20626968
Fax: +33-3-20626993

S. Lancel · X. Maréchal · R. Neviere
Faculté de Médecine 1,
Département de Physiologie,
Place Verdun, 59045 Lille, France

Abstract *Objective:* We examined whether activated protein C (APC) treatment improves cardiovascular inflammation and dysfunction in endotoxemic rats. *Design and setting:* Randomized, controlled trial in an experimental laboratory of a university physiology department *Subjects:* Male Sprague Dawley rats. *Interventions:* Internal carotid artery and external jugular vein were catheterized under sterile conditions in rats. Instrumented rats infused or not with APC (240 μg/kg per hour) were challenged with *E. coli* endotoxin (10 mg/kg). Four hours after endotoxin challenge rats were prepared for cardiovascular functional studies and tissue and blood analyses. *Measurements and results:* Endotoxin administration induced systemic hypotension, depression of myocardial systolic performance and reduction in capillary density of the small intestine muscularis layer. Plasma levels of nitrite/nitrate, tumor necrosis factor α and macrophage migration inhibitory factor, mesentery venule leukocyte-endothelium interactions, heart and small intestine myeloperoxidase activities were increased in endotoxin-treated rats. APC largely prevented endotoxin-induced cardiovascular dysfunction with improved systemic hemodynamics, functional capillary density, and myocardial contractile performance. Beneficial cardiovascular effects of APC were associated with attenuation of entotoxin-induced inflammatory response in terms of plasma levels of nitrite/nitrate, tumor necrosis factor α, macrophage migration inhibitory factor, and endothelial cell–leukocyte activation. *Conclusion:* APC reduces systemic and tissue inflammation and preserves cardiovascular function during experimental endotoxemia.

Keywords Activated protein C · Endotoxin · Myocardial dysfunction · Leukocyte · Cytokines

Introduction

Septic shock due to Gram-negative, Gram-positive, and fungal infections is characterized by acute circulatory failure with major reductions in peripheral vascular resistance and myocardial dysfunction [1, 2]. Marked cardiovascular dysfunction has been observed in human following administration of endotoxin (lipopolysaccharide, LPS), which is characterized by decreased ventricular ejection fraction, biventricular dilatation, and altered cardiac index [3]. Mechanisms proposed to explain endotoxin-induced cardiovascular dysfunction include microvascular dysfunction, presence of activated leukocytes, production of large amounts of nitric oxide and oxygen reactive species, and effects of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) α and interleukin (IL) 1β [1, 2, 4]. More recently the contribution of coagulopathy to the pathophysiology of endotoxin-induced sepsis has become more widely understood and has increased interest in compounds that modulate coagulation cascade such as antithrombin, tissue factor pathway inhibitor, and activated protein C (APC) [5, 6].

Over the past decade better understanding of sepsis pathophysiology has emerged focused on tight coupling of inflammation and coagulation processes [2, 5, 6]. For example, rapid and prolonged depletion of protein C, which is typical during sepsis and endotoxemia, may lead to uncontrolled cascade of inflammation, coagulopathy, and endothelial cell dysfunction [7]. Recent experimental results suggest that administration of antithrombotic factors such as APC itself may preserve microcirculatory blood flow [8, 9], whereas their anti-inflammatory properties may prevent organ injury [6]. In line with this view, benefit was recently obtained in the recombinant human APC worldwide evaluation in severe sepsis (PROWESS) trial, which shown reduced mortality among APC-treated patients [10].

Since net beneficial effects of APC treatment on endotoxin-induced cardiovascular failure have not been extensively evaluated, we tested whether APC treatment improves cardiovascular function in rats infused with *Escherichia coli* endotoxin. Specifically, we 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-α, macrophage migration inhibitory factor (MIF), and nitrite/nitrate levels. Our results provide important new information that APC reduces generalized vascular and systemic inflammation and preserves cardiovascular homeostasis during experimental endotoxemia.

Materials and methods

Animal preparation

This study was performed in accordance with European and National Institutes of Health guidelines for the use of experimental animals with approval from Lille's Animal Research Committee. After anesthesia was induced with intramuscular ketamine (50 mg/kg body weight) and xylazine (15 mg/kg body weight) Sprague Dawley rats (Harlan, Gannat, France; weight 275–300 g) were placed supine on a surgical board while breathing air. The internal carotid artery and external jugular vein were then catheterized under sterile conditions and were tunneled subcutaneously to the back of the neck and attached to a swivel device. During surgery rat rectal temperature was monitored and maintained at 37°C using a heating pad. Systolic arterial blood pressure was maintained above 80 mmHg using normal saline infusion if necessary. Rats were allowed to recover for 60 min. Normal saline infusion was administered to assure the patency of intravascular lines, if required. Intramuscular nalbuphine (10 mg/kg body weight) was used postoperatively to produce adequate analgesia.

Treatment protocol

Instrumented rats were randomized to receive either human albumin (240 μg/kgbody weight per hour) or APC (drotrecogin alpha, 240 μg/kg per hour) in saline infusion (2 ml/h). Recombinant rat APC was a generous gift from Eli Lilly, Indianapolis, Ind., USA. Immediately after the beginning of albumin or drotrecogin infusion rats were treated intravenously with either 500 μl saline (control) or 10 mg/kg LPS endotoxin (*E. coli* 055:B5 Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in 500 μl saline (LPS). Four groups of rats were studied: (a) control, (b) APC control, (c) LPS-treated rats, and (d) APC/LPS-treated rats. Physiological and biological measurements were performed 4 h after saline and LPS administration. In the first series of experiments rats ($n = 12$ in each group) used prepared for myocardial function and blood sampling. In the second series rats ($n = 12$ in each group) used prepared for intravital microscopy and tissue sampling.

Hemodynamic measurements

Arterial catheter was connected to a pressure transducer (Baxter Healthcare, Irvine, Calif., USA) coupled to a Biopac Data Acquisition System (Biopac Systems, Calif., USA) to record arterial pressure and mean arterial pressure. Myocardial contractile function was studied using a modified Langendorff isolated heart preparation as previously described [11]. Briefly, following brief isoflurane anesthesia the heart was rapidly excised and placed into ice-cold Krebs-Henseleit buffer solution. Then the heart was mounted onto a Langendorff heart perfusion apparatus and perfused in a retrograde fashion via the aorta at a constant flow rate of 10 ml/min with aerated (95% O_2 5% CO2) Krebs-Henseleit buffer at 37°C. Cardiac contractile function was assessed using a water-filled latex balloon inserted into the left ventricular (LV) cavity and connected to a pressure transducer. This balloon was then adjusted to an LV end-diastolic pressure (LVEDP) of 5 mmHg. The heart was paced at 300 bpm and allowed to equilibrate for 30 min. LV developed pressure (LVDP), its first derivatives (dP/dt_{max} and dP/dt_{min}) and coronary perfusion pressure (CPP) were monitored and recorded using a Biopac Data Acquisition System.

Intravital microscopy

Rats were anesthetized with ketamine (50 mg/kg body weight) and xylazine (15 mg/kg body weight). After midline laparotomy a segment of the distal ileum was gently exposed and mounted in an optical chamber as previously described [12]. Exposed bowel wall within the chamber was superfused with a thermostat-controlled saline solution maintained at 37°C. After a 30-min equilibration

period the mesenteric microcirculation was observed by intravital microscope (Eclipse E800 Nikon, Tokyo, Japan) fitted with a Xenon light source.

Single unbranched mesenteric venules (25–40 μM in diameter) were selected for study of each animal [11]. Red blood cell velocity (V_{RBC}) was measured off-line as the distance through which packed red blood cells or plasma break traveled within two subsequent video-frame periods of 40 ms. Mean red blood cell velocity was determined as $V_{RBC}/1.6$ and wall shear rate was calculated based on the Newtonian definition, shear rate = $(V_{RBC}/Dv) \times (8/s)$, where Dv is the venular diameter.

Leukocyte behavior in the venules was observed for 1 min after the injection of 1 ml 1% w/v acridine orange into the carotid artery. Leukocyte rolling flux was determined off-line during play-back of videotaped images by counting the number of leukocytes distinguishable from the blood stream passing a line perpendicular to the vessel axis. Flux of rolling leukocytes was measured as the number of white blood cells that could be seen rolling past a fixed perpendicular line in the venule during a 1-min period. Quantification of venular endothelium leukocyte adherence was performed off-line during play-back of videotaped images by counting the number of leukocytes that stuck and remained stationary for a more than 30 s per 100 μm of venule.

In the same preparation capillary density of the muscularis layer, which served as the measure of quality of microvascular perfusion, was studied by focusing up through mesentery views. Microvascular flow in the muscularis layer (ten fields examined for a period of 60 s in each animal) was recorded and analyzed off-line. Three equidistant horizontal and three equidistant vertical lines were drawn on images. Functional capillary density was calculated as the number of vessels crossing these lines divided by the total length of the lines and is given as number per millimeter.

Measurements of tissue myeloperoxidase activity

Myeloperoxidase (MPO) activities of heart left ventricle and ileum were used as an index of leukocyte infiltration [11]. Samples were used in reactions for MPO activity determined spectrophotometrically (650 nm) by measuring hydrogen peroxide-dependent oxidation of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (Sigma).

Plasma nitrite/nitrate, TNF-alpha, and MIF concentrations

Nitrite/nitrate level, an indicator of nitric oxide synthesis, was measured in plasma samples by the mean of the Griess reaction, as described previously [11]. Plasma levels of TNF-α and MIF were determined by the means of commercially enzyme-linked immunosorbent assay kits specific for rat TNF (Quantikine Murine rat TNF, R&D Systems, Abingdon, UK) and mouse MIF cytokine (Chemicon International Euromedex, Mundolsheim, France).

Statistical analysis

Analysis of variance (SPSS for Windows 9.0) was used to assess biological and cardiovascular function studies. When a significant difference was found, we examined between-group differences using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After applying Bonferroni's correction, the level of statistical significance was set at $p < 0.05$ for comparisons with control. Data are presented as means ± SEM throughout.

Results

Clinical symptoms and adverse events

At the time of being killed rats treated with LPS (10 mg/kg) showed diarrhea, shivering, and lethargy. In rats receiving APC there were no instances of increased bleeding at arterial and venous catheters. Neither ma-

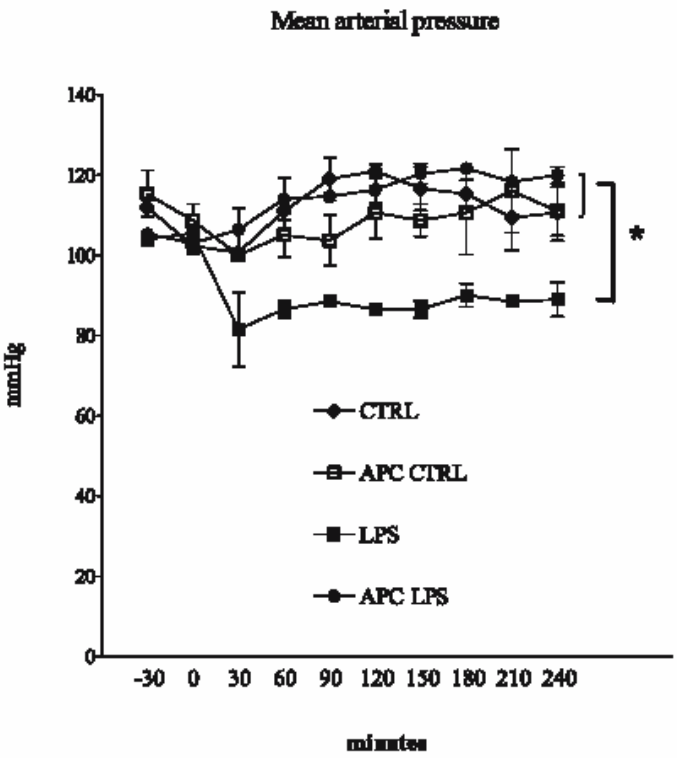


Fig. 1 Changes in mean arterial pressure in control (*CTRL*), activated protein C control (*APC*), lipopolysaccharide (*LPS*), and APC-treated LPS (*APC LPS*) rats. Results are mean ± SEM ($n = 24$ in each group). $^*p < 0.05$ vs. CTRL

jor bleeding event at autopsy nor study mortality was observed in rats treated with APC.

Physiological variables

Figure 1 shows mean arterial pressure measurements in the four groups of rats. APC had no effects on mean arterial pressure in control rats. APC reduced LPS-induced drops in mean arterial pressure.

Myocardial function

APC had no effect on LV systolic performance in control rats. LPS induced reductions in LV systolic performance in the absence of changes in coronary perfusion pressure. Reduction in LV systolic performance was prevented in APC-treated LPS rats (Fig. 2).

Intravital microscopy observations

In a separate series of experiments rats ($n = 12$ in each group) were prepared for intravital microscopy. Functional capillary density (Table 1) of the small intestine muscularis layer was markedly lower in LPS rats than in controls. APC partially prevented microvascular perfusion deficit in LPS rats, whereas no effects were observed in controls. Likewise, mean red blood cell velocity and wall shear rate (Table 1), which were lower in LPS rats than in controls, were partially restored in APC-treated LPS rats. Leukocyte rolling and adhesion (Fig. 3) on the mesenteric venule endothelial surface were increased after LPS injection. APC reduced leukocyte rolling (Fig. 3a) and adhesion (Fig. 3b) in LPS rats.

Tissue leukocyte infiltration and plasma indexes of inflammation

MPO activity, an index of leukocyte tissue sequestration, was studied in small intestine and heart tissues ($n = 12$ in each group). APC prevented increases in heart (data not shown) and small intestine MPO activity (Fig. 3c) induced by LPS administration. Plasma levels of nitrite/nitrate, TNF-α, and MIF were studied in rats ($n = 12$ in each group). Increases in plasma nitrite/nitrate, TNF-α and MIF concentrations in LPS rats were largely prevented in APC-treated LPS rats (Fig. 4).

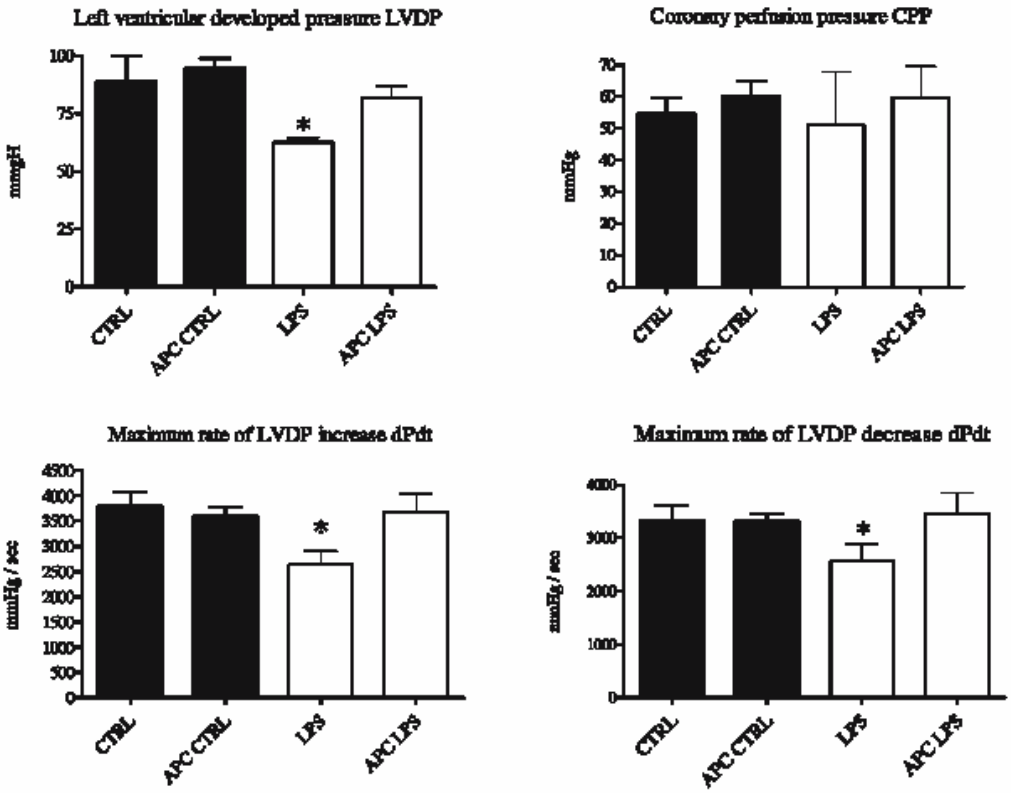
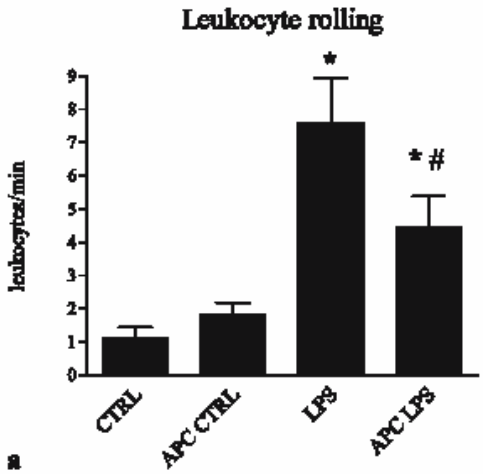
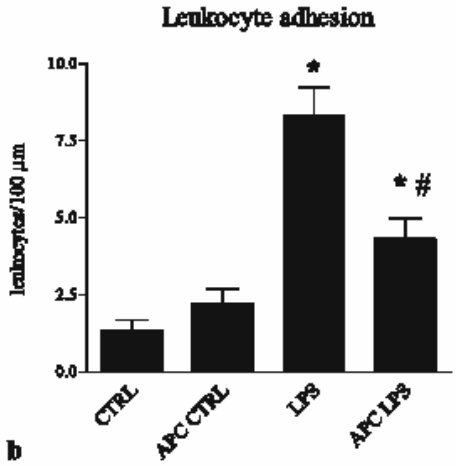


Fig. 2 Evaluation of hemodynamic parameters in a modified Langendorff isolated heart preparation in control (*CTRL*), activated protein C control (*APC*), lipopolysaccharide (*LPS*), and APC-treated LPS (*APC LPS*) rats. Results are mean ± SEM ($n = 12$ in each group). * $p < 0.05$ vs. CTRL





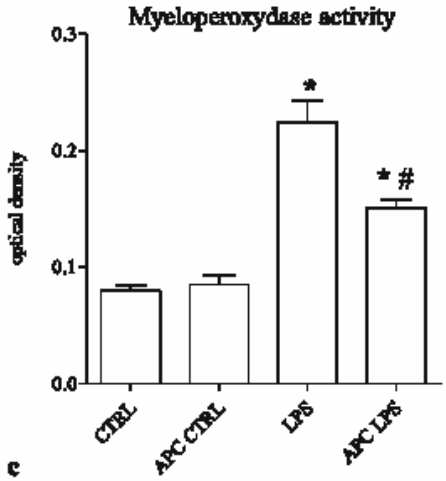
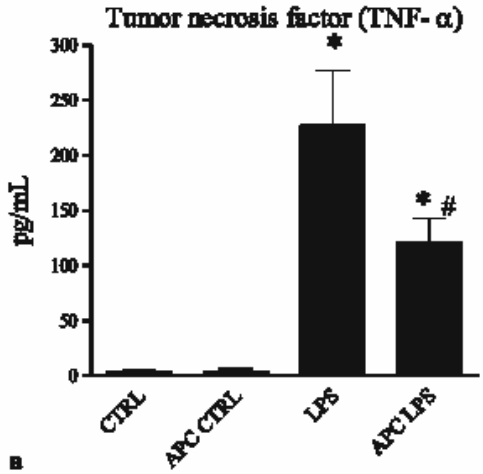
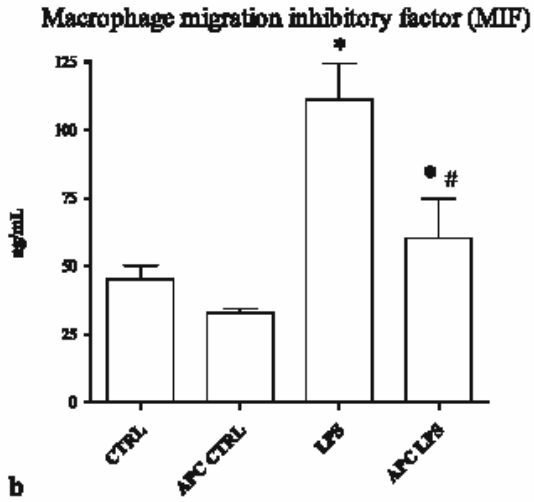


Fig. 3 Leukocyte behavior and myeloperoxydase activity in control (*CTRL*), activated protein C control (*APC*), lipopolysaccharide (*LPS*), and APC-treated LPS (*APC LPS*) rats. Results are mean ± SEM ($n = 12$ in each group). * $p < 0.05$ vs. CTRL, # $p < 0.05$ vs. LPS





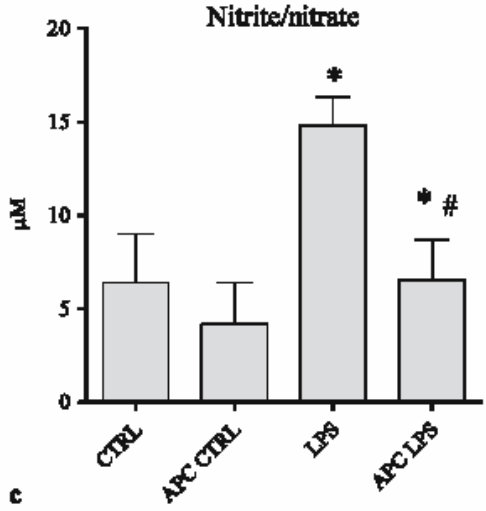


Fig. 4 Plasma levels of tumor necrosis factor (*TNF*) α, macrophage migration inhibitory factor (*MIF*), and nitrite/nitrate in control (*CTRL*), activated protein C control (*APC*), lipopolysaccharide (*LPS*), and APC-treated LPS (*APC LPS*) rats. Results are mean ± SEM ($n = 12$ in each group). * $p < 0.05$ vs. CTRL, # $p < 0.05$ vs. LPS

Table 1 Mesentery venular shear rate and small intestine muscularis layer capillary density in four groups of rats ($n = 12$ in each group): control (*CTRL*), activated protein C control (*APC CTRL*), lipopolysaccharide (*LPS*), and activated protein C treated LPS (*APC LPS*). Shear rate is calculated as (V_{RBC}/Dv) × (8/s), where Dv is the venular diameter and V_{RBC} is the mean red blood cell velocity; functional capillary density of the muscularis layer is calculated as the number of vessels crossing lines divided by the total length of lines and is given as number per millimeter. Results are presented as mean ± SEM

	CTRL	APC CTRL	LPS	APC LPS
Shear rate (s^{-1})	623 ± 80	678 ± 52	157 ± 22*	343 ± 29*,**
Capillary density (mm^{-1})	6.4 ± 0.4	6.8 ± 0.6	2.4 ± 0.6*	4.4 ± 0.2*,**

* $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs.LPS

Discussion

APC, a serine protease with systemic anticoagulant and anti-inflammatory activity may reduce organ damage in animal models of sepsis [7, 8, 9] and in human severe sepsis [10, 13]. Growing evidence also suggests that APC can protect directly cell function through interactions with endothelial protein C and protease activated receptors [12, 14, 15]. Here we report that APC largely prevented endotoxin-induced cardiovascular dysfunction, which was characterized in our model by systemic hypotension, functional capillary density reductions, and impaired myocardial contractile performance. APC also attenuated entotoxin-induced inflammatory response in terms of plasma levels of TNF-α, MIF, and nitrite/nitrate and endothelial cell–leukocyte activation.

Beneficial cardiovascular effects of APC have been suggested by analysis of secondary end-points of the severe sepsis patient (PROWESS) trial [10]. Time-to-event analysis further demonstrated more rapid improvement in cardiovascular dysfunction in APC-treated patients than with placebo over the first week [13]. Moreover, better maintenance of blood pressure was observed in both rats and human volunteers exposed to endotoxin and treated with APC [16, 17]. In septic shock patients APC rapidly improves the hemodynamic status with lower dose of norepinephrine required to maintain mean arterial pressure [18]. At the microcirculation level APC may also improve capillary density in hamster skinfold during endotoxemia [8]. Consistently we found that deterioration in arterial pressure and small intestine muscular layer microvascular perfusion were prevented by APC in endotoxin-treated rats. In this context of microvascular injury induced by endotoxin no adverse effects such as hemorrhage or local microbleeding were observed in rats treated with APC [8, 9]. However, risk of bleeding associated with APC treatment in the human experience is still present and may draw into question the applicability of our findings clinically.

APC improved endotoxin-induced myocardial function which was evaluated in isolated heart preparations. Because physiological evaluation of global cardiac function in sepsis has been challenging due to preload and after load alterations [1, 2], we assessed LV systolic performance in ex vivo isolated heart preparation. Hearts isolated from APC-treated endotoxemic rats had better LV systolic performance than endotoxemic rats, which was observed in absence of coronary perfusion pressure changes, suggesting that APC affects intrinsic heart contractility independently of changes in coronary hemodynamics. Taken together, the results of our experiments and those reported by other groups [16, 17] may be clinically important since death due to septic shock commonly results from refractory hypotension and multiple organ failure [1, 2].

The most apparent mechanism for APC is by altering the deranged microcirculation and coagulation in sepsis [6, 7, 8, 9]. However, the myriad effects of APC and the inability of other anticoagulants to alter outcome in septic patients suggest that the actual mode of effect does not only rely on its effect on coagulation [12, 14, 15]. APC has been shown experimentally to have an anti-inflammatory effect by inhibiting leukocyte activation [8, 9], nitric oxide synthase expression [16], and production of cytokines such as TNF-α, IL-1β, and IL-6 [5, 6, 10]. Consistently we found that APC attenuated entotoxin-induced inflammatory response in terms of mesentery venule endothelial cell–leukocyte activation and plasma levels of nitrite/nitrate, TNF-α, and MIF. Increased production of nitric oxide metabolites has been implicated in the pathophysiology of both vascular and myocardial depression induced by sepsis [2, 4, 11]. Here the reduction in nitrite/nitrate, an index of nitric oxide metabolism, may explain at least part the beneficial effects of APC on vascular and myocardial dysfunction. TNF-α and MIF have also been identified as a myocardial

depressant factor in septic shock. TNF-α can impair myocardial function by mechanisms such as activation of the neutral sphingomyelinase, suppression of calcium transient, and inhibition of the mitochondrial function [2, 4]. MIF is increased in the plasma of animals and humans during septic shock, and the blockade of its activity by monoclonal or polyclonal antibodies results in a marked improvement in the survival of animals with experimentally induced sepsis [19]. Thus in endotoxin-treated rats the reductions in TNF-α and MIF levels achieved by APC could participate in myocardial function improvement. The improvement in cardiovascular failure observed in endotoxemic rats may perhaps be related to the known properties of APC on leukocyte behavior. Using intravital microscopy of the rat mesentery venule, we showed that APC reduced leukocyte rolling and adhesion in endotoxemic rats. A likely mechanism by which APC reversed endotoxin-induced leukocyte sequestration includes improved blood flow (i.e., increased shear rates) that oppose to leukocyte adhesion. APC may also directly reduce leukocyte rolling and/or adhesion through its effects on E- and P-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 expression [20, 21].

In conclusion, our results demonstrate a role for APC as a potential therapeutic tool to improve cardiovascular dysfunction/failure in sepsis. Secondly, our data show that both myocardial function and microvascular perfusion deficit are improved by APC. Finally, our data reveal that the beneficial effects of APC on endotoxin-induced organ dysfunction may be due to both improved hemodynamics and the effects of this compound on leukocyte adhesion.

References

1. Young JD (2004) The heart and circulation in severe sepsis. Br J Anaesth 93:114–120
2. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. Lancet 365:63–78
3. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE (1989) The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. N Engl J Med 321:280–287
4. Hotchkiss RS, Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 348:138–150
5. Esmon CT (2004) Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. Trends Immunol 25:536–542
6. Esmon CT (2005) Coagulation inhibitors in inflammation. Biochem Soc Trans 33:401–405
7. Haley M, Cui X, Minneci PC, Deans KJ, Natanson C, Eichacker PQ (2004) Activated protein C in sepsis: emerging insights regarding its mechanism of action and clinical effectiveness. Curr Opin Infect Dis 17:205–211
8. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD (2004) Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. Crit Care Med 32:1011–1017
9. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Shirahama A, Ida Y (2005) Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. Crit Care Med 33:368–372
10. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med 344:699–709
11. Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R (2004) Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. J Am Coll Cardiol 43:2348–2358
12. Liu D, Cheng T, Guo H, Fernandez JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV (2004) Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. Nat Med 10:1379–1383
13. Vincent JL, Angus DC, Artigas A, Kalil A, Basson BR, Jamal HH, Johnson G 3rd, Bernard GR (2003) Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. Crit Care Med 31:834–840
14. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV (2003) Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. Nat Med 9:338–342
15. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA, Griffin JH, Zlokovic BV (2004) Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. Neuron 41:563–572
16. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K (2001) Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. Circulation 104:1171–1175
17. Kalil AC, Coyle SM, Um JY, LaRosa SP, Turlo MA, Calvano SE, Sundin DP, Nelson DR, Lowry SF (2004) Effects of drotrecogin alfa (activated) in human endotoxemia. Shock 21:222–229
18. Monnet X, Lamia B, Anguel N, Richard C, Bonmarchand G, Teboul JL (2005) Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. Intensive Care Med 31:1573–1576
19. Chagnon F, Metz CN, Bucala R, Lesur O (2005) Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. Circ Res 96:1095–1102
20. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. J Biol Chem 276:11199–11203
21. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T (2000) Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. Blood 95:3781–3787

Article n°3

Dans ce travail nous avons testé l'hypothèse que la protéine C activée avait d'autres effets que la prévention de la cascade inflammatoire et qu'elle pouvait avoir des effets antioxydants d'une part, et qu'elle pouvait avoir un effet préventif sur la dégradation du glycocalyx endothélial par ailleurs. Pour la première fois, nous montrons d'une part que l'épaisseur du glycocalyx diminue après un choc au LPS, probablement à cause d'une dégradation plus importante (dosage d'acide hyaluronique plasmatique) et d'autre part que cet effet pouvait être prévenu par la protéine C activée.

Nous montrons également pour la première fois que la protéine C activée a des effets antioxydants dans le cadre du sepsis comme en témoigne les effets sur les MDA intestinaux, les protéines carbonylées plasmatiques et le marquage par la DHR 1,2,3 en vidéomicroscopie intravitale.

La dose-réponse de la noradrénaline montre un effondrement de la réponse chez les rats LPS, cet effet étant prévenu par la protéine C activée, sans passer par une augmentation des catécholamines plasmatiques qui aurait pû être moins dégradées grâce à l'effet antioxydant de la protéine C activée.

ENDOTHELIAL GLYCOCALYX DAMAGE DURING ENDOTOXEMIA COINCIDES WITH MICROCIRCULATORY DYSFUNCTION AND VASCULAR OXIDATIVE STRESS

Xavier MARECHAL *,†, ‡
Raphael FAVORY *, ‡
Olivier JOULIN *
David MONTAIGNE *,†
Sidi HASSOUN *,†
Brigitte DECOSTER *,†
Farid ZERIMECH §
Remi NEVIERE *,†

* EA 2689, IMPRT –IFR114, Université de Lille 2, France
† Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Lille, France
§ Laboratoire de Biochimie - Biologie Moléculaire, CHRU Lille, France

‡ Xavier MARECHAL and Raphael FAVORY equally contributed to this work

Corresponding author:
Remi NEVIERE
Département de Physiologie, Faculté de médecine; 1, place de Verdun, Lille 59045 France ;
Tel: 33 3 20 62 69 68; Fax: 33 3 20 62 69 93; e-mail: rneviere@univ-lille2.fr

All source(s) of support:

1. Activated protein C was a gift from Ely Lilly Indianapolis, USA
2. Funding from EA269 University of Lille, France

Abbreviated title: LPS induces glycocalyx degradation

ABSTRACT (216 words)

The glycocalyx constitutes the first line of the blood tissue interface and is thus involved in many physiological processes, deregulation of which may lead to microvascular dysfunction. Because sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS) is accompanied by severe microvascular dysfunction, the purpose of the study was to investigate microvascular glycocalyx function in this pathological condition. Bolus infusion of LPS (10 mg/kg) to male Sprague Dawley rats elicited the development of hyporeactivity to vasoactive agents and microvascular derangements including decreased capillary density and significant increases in intermittent and stopped flow capillaries in the small intestine muscularis layer compared to controls. LPS elicited plasma hyluronan release and reduction in endothelial surface thickness, indicative of glycocalyx degradation. Because endothelial glycocalyx is extremely sensitive to free radicals, oxidative stress was evaluated by oxidation of dihydrorhodamine in microvascular beds and levels of heart malondialdehyde and plasma carbonyl proteins, which were all increased in LPS-treated rats. Activated protein C (240 [[mu]]g/kg/h) enhanced systemic arterial pressure response to norepinephrine in LPS-treated rats. Activated protein C (240 [[mu]]g/kg/h) prevented capillary perfusion deficit in the septic microvasculature which were associated with reduced oxidative stress and preservation of glycocalyx. Our findings support the conclusion that LPS induces major microcirculation dysfunction accompanied by microvascular oxidative stress and glycocalyx degradation which may be limited by activated protein C treatment.

Key Words: lipopolysaccharide; microcirculation; oxidative stress, glycocalyx, intravital microscopy, rats

INTRODUCTION

Severe sepsis and septic shock are common and associated with substantial mortality and substantial consumption of health care resources (1). Poor outcome in sepsis has been related to impaired vascular reactivity and distributive abnormalities of microvascular blood flow within injured vital organs (2). Indeed, we (3) and other groups (4,5) have reported decreased capillary density, spatial and temporal perfusion heterogeneity and reduction in red blood cell velocity, which are implicated in sepsis-induced oxygen extraction deficit and tissue hypoxia. Diverse molecular mechanisms of inflammation and cellular damage participate in the pathogenesis of sepsis-induced vascular failure (2,5). In addition, there is emerging evidence of the importance of endothelial cell glycocalyx in the inflamed microvasculature (6), and, given its key location at the interface between plasma and endothelial cells, we believe it plays a critical role in the microvascular response to sepsis.

The endothelial cell glycocalyx is an as-yet poorly understood matrix that lines the luminal surface of all blood vessels (6). This coat includes glycolipids, glycoproteins, and proteoglycans and constitutes the endothelial glycocalyx in strict sense (7). *In vivo* experimental studies led to the concept that endothelial surface is covered with a stationary layer which is much thicker than the glycocalyx described above (6,8). This endothelial surface layer plays a role in barrier properties of capillary wall as a whole and evidence suggest that hematocrit and flow resistance, permeability, coagulation and leukocyte adhesion may all be regulated by the glycocalyx (6,8). Loss of glycocalyx leads to a wide spectrum of vascular abnormalities in experimental models of ischemia-reperfusion injury (9), diabetes (10), and altered lipoprotein levels (11). To our knowledge, no study has previously examined whether sepsis would affect endothelial glycocalyx structure.

Therapeutics such as activated protein C with potential microcirculatory impacts has been shown to be effective in reducing mortality (12,13). Experimental studies further elucidate the mechanisms of action of activated protein C on the microcirculation during sepsis. Consistently, different groups reported that activated protein C prevented lipopolysaccharide-induced functional capillary density deficit, neutrophil-endothelial cell adhesion, and improved control of microvascular tone (14,15). Because part of these vasculoprotective properties can be related to the glycocalyx, we sought to investigate the effects of activated protein C on endothelial glycocalyx in sepsis.

The present study was undertaken to primarily test whether microvascular dysfunction induced by LPS would coincide with endothelial glycocalyx degradation in rats. We next tested whether activated protein C would preserve microvascular dysfunction induced by LPS through mechanisms involving vascular reactivity improvement, reduced oxidative stress and preservation of endothelial glycocalyx.

MATERIALS AND METHODS

Animal preparation

This study was performed in accordance with European and National Institutes of Health guidelines for the use of experimental animals with approval from Lille's Animal Research Committee. After anesthesia was induced with intramuscular ketamine (50 mg/kg body weight) and xylazine (15 mg/kg body weight), Sprague Dawley rats (Harlan, Gannat, France) (weight 275-300g) were placed supine on a surgical board while breathing air. Subsequently, internal carotid artery and external jugular vein were catheterized under sterile conditions and were tunnelled subcutaneously to the back of the neck where attached to a swivel device. During surgery, rat rectal temperature was monitored and maintained at 37°C using heating pad. Systolic arterial blood pressure was maintained > 80 mmHg using normal saline infusion if necessary. Rats were allowed to recover for 60 minutes. Intramuscular nalbuphine (10 mg/kg body weight) was used post operatively to produce adequate analgesia.

Treatments and study design

Instrumented rats were randomized to receive either human albumin (240 µg/kg/h body weight) or activated protein C (240 µg/kg/h) in saline infusion (2 mL/h). Recombinant rat activated protein C was a generous gift from Eli Lilly, Indianapolis, USA. Immediately after the beginning of albumin or activated protein C infusion, rats were treated with either 500 µL saline iv (controls) or 10 mg/kg LPS endotoxin (*Escherichia coli* 055:B5 Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in 500 µL saline iv (LPS). Where used, norepinephrine (NE) was given as a 0.3mL bolus i.v. injection and endothelium-dependent and -independent vasodilation was determined by injection of acetylcholine (Ach 0.01, 0.1 and 1µg/kg; 0.3mL bolus i.v.) and sodium nitroprusside (SNP 2.5, 7.5 and 10µg/kg; 0.3mL bolus i.v.).

All physiological and biological measurements were performed 4h after saline and LPS administration. Four groups of rats were studied, i.e., control, activated protein C control, LPS treated rats and activated protein C LPS treated rats. In the first series of experiments, rats (n=8 in each group) were prepared for evaluation of hemodynamic response to vasoconstrictor and vasodilating agents, blood and tissue sampling. In the second series of experiments, rats were prepared for *in vivo* microscopy, which was conducted in two independent series of experiments, i.e. apparent endothelial surface layer measurements (4 groups of 8 rats) and evaluation of microvascular oxidative stress (4 groups of 8 rats).

Physiological measurements

Hemodynamic measurements: Arterial catheter was connected to a pressure transducer (Baxter Healthcare Corporation, Edwards lab., Irvine, CA, USA) coupled to a Biopac Data Acquisition System (Biopac Systems Inc., CA, USA) to record arterial pressure.

Intravital microscopy: Rats were anesthetized with ketamine (50 mg/kg body weight) and xylazine (15 mg/kg body weight). After midline laparotomy, a segment of the distal ileum was gently exposed and mounted in an optical chamber as we have previously described. Exposed bowel wall within the chamber was superfused with a thermostat-controlled saline solution maintained at 37°C. After a 30 min equilibration period, the mesenteric microcirculation was observed with the use of an intravital fluorescence microscope (Eclipse E50i Nikon, Tokyo, Japan) fitted with a Xenon light source and long working distance objective (Plan Fluor 20x/0.45 WD7.4, Nikon Tokyo, Japan). The images of arterioles, venules and capillaries were obtained through a charge-coupled device (CCD) video camera system (Coolsnap *cf*, Photometrics, Roper Scientific, Inc., Evry, France). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph and Metaview software (Roper Scientific, Inc., Evry, France).

Microvascular flow in the muscularis layer (10 fields examined for a period of 60 s in each animal) were recorded and analyzed off-line. Three equidistant horizontal and three equidistant vertical lines were drawn on images. Functional capillary density (CD) was calculated by an operator (blinded as to the condition of the animal) as the number of vessels crossing these lines divided by the total length of the lines and is given as number per millimeter.

Capillaries that intersected the reference lines were classified over a 30-s time interval as being either, 1) continuous (cont), 2) intermittent (int), or 3) stopped (stop). Functional capillary density information (for example, CDstop) was calculated as the number of capillaries per millimeter test line and was expressed as a percentage of the total capillary density (for example, %CDstop).

Apparent thickness of the capillary endothelial surface layer was evaluated as previously described (8,9) in capillaries by the mean of intravital microscopy by comparing 4 and 150 kD dextran distribution as markers of glycocalyx permeable and impermeable tracers, respectively. To determine the thickness of the endothelial surface coat, fluorescently FITC-Dextran molecules were dissolved in normal saline (2 mg/ml) and injected as a bolus (0.3–0.4 ml). FITC-Dextran 4 and 150 kD (Sigma, France) were used to probe the penetration rates of the endothelial surface layer (excitation 480 nm; emission 520 nm). Estimates of the apparent thickness of the endothelial surface layer were obtained using Metamorph software by subtracting the diameters of the FITC-Dextran 4 column from the FITC-Dextran 150 column. Thickness of capillary columns (50 µm length) was measured in the same microvascular area of the muscularis layer and averaged (3 independent measurements per field).

To quantify generation of oxidants by the cells in the area under study, the oxidant-sensitive fluorochrome dihydrorhodamine (DHR-123 (Molecular Probes, Eugene, Invitrogen, France) was superfused (10 µmol/L) onto the mesentery as previously described. During an initial 30-

min stabilization period, the mesenteric preparation was superfused with DHR-free BBS, and a background autofluorescence image was recorded. The fluorescence intensity (excitation 480 nm; emission 536 nm) of the vessels under study and the background fluorescence before superfusing DHR-123 were measured. An index of free radical generation in the intravascular areas was obtained after subtracting background fluorescence from fluorescence intensity in the area of interest.

Measurements of tissue malondialdehyde and plasma protein carbonyl levels

Malondialdehyde (MDA) formation was utilized to quantify the lipid peroxidation in tissues and was measured as thiobarbituric acid reactive material. Tissues were homogenized (100 mg/ml) in 1.15% KCl buffer. The homogenates (200 µl) were then added to a reaction mixture consisting of 1.5 ml of 0.8% thiobarbituric acid, 200 µl of 8.1% sodium dodecyl sulfate, 1.5 ml of 20% acetic acid (pH 3.5), and 600 µl of distilled H2O. The mixture was then heated at 90° C for 45 min. After cooling to room temperature, samples were cleared by centrifugation (10,000 × g, 10 min) and their absorbance measured at 532 nm, using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. The level of lipid peroxides was expressed as nanomoles of MDA per milligram of protein (Bradford assay). Evaluation of protein carbonyls is based on spectrophotometric detection of the reaction of 2,4-dinitrophenylhidrazine with protein carbonyl to form protein hydrazones. The oxidized protein was assessed by determination of carbonyl concentrations by the mean of a commercially available kit (Cayman, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Plasma hyaluronan and catecholamine concentrations

Hyaluronan present in plasma was determined using the Corgenix hyaluronic acid test kit (Corgenix Inc., Westminster, USA) that is based on an enzyme-linked hyaluronic acid binding

protein (HABP) assay. Hyaluronan is the principal constituent of endothelial glycocalyx and its concentration increase has been related to glycocalyx volume loss (10). Plasma catecholamine levels were measured by radioimmunoassay with commercially available kits (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Germany).

Statistical analysis

Results were analyzed with the SPSS for Windows software, version 11.0.1 (SPSS France, Paris-la-Défense, France). Data represent mean ± S.E.M and were analyzed by ANOVA procedures. When a significant difference was found, we identified specific differences between groups using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of the Bonferroni correction, $P<0.05$ was taken as a level of statistical significance.

RESULTS

Characterization of the cardiovascular dysfunction induced by LPS administration

Administration of LPS lead to the development of cardiovascular hypo-responsiveness to exogenously administered norepinephrine (NE), a potent α-adrenergic agonist with some β-adrenergic agonist effects. Four hours after LPS injection, raises in mean arterial pressure (MAP) in response to NE (0.1–1 mμ/kg) were greatly reduced compared to controls (Figure 1A). Compared to controls, endothelium-dependent (acetylcholine, Figure 1B) and endothelium-independent vasodilation (sodium nitroprusside, data not shown) were not altered in LPS treated rats. Plasma catecholamine levels increased in LPS treated rats compared to control rats (Figure 1C). Significant decreases in continuous flow and significant increases in intermittent and stopped flow were observed in capillaries of the small intestine muscularis layer of LPS treated rats (Table 1). In addition, LPS consistently elicited *in vivo*

oxidation of dihydrorhodamine within the small intestine microvasculature (Figure 2A). which was accompanied by moderate increases in tissue malondialdehyde concentration and plasma protein carbonyl level (Figure 2B. 2C). Apparent thickness of the endothelial surface layer was evaluated in small intestine capillaries by comparing 4 and 150 kD dextran distribution as markers of glycocalyx permeable and impermeable tracers. respectively (Figure 3A). LPS treatment elicited a profound reduction in endothelial glycocalyx layer thickness (Figure 3B). which was accompanied by increases in plasma levels of hyaluronan. an endothelial glycocalyx constituent (Figure 3C).

Microvascular effects of recombinant rat activated protein C in LPS treated rats

Recombinant rat activated protein C at a dose of 240µg/kg/min prevented reduction in responses to NE in LPS treated rats. whereas responses to NE in control rats were unaffected by activated protein C. Endothelium dependent (Figure 1B) and endothelium-independent (data not shown) vasodilation was not altered by recombinant rat activated protein C. Recombinant rat activated protein C fully prevented perturbations in spatial and temporal heterogeneity of capillary perfusion in LPS treated rats with reduction in intermittent and stopped flow capillaries (Table 1). Interestingly. treatment with recombinant rat activated protein C prevented increases in oxidative stress markers (Figure 2) and glycocalyx destruction which were associated with LPS infusion (Figure 3).

DISCUSSION

The findings of the present study suggest that microvascular dysfunction observed in lipopolysaccharide (LPS) treated rats coincides with increased oxidative stress and loss of endothelial glycocalyx. Of note, activated protein C treatment in septic LPS rats was accompanied by major vasculoprotective impacts, which include improvement in systemic and microvascular failure and reductions in vascular oxidative stress and glycocalyx destruction.

Consistent with previous observations (3,4,5), LPS treated rats displayed loss of capillary density with decreases in continuous flow and significant increases in intermittent and stopped flow capillaries within the small intestine muscularis layer. Proposed mechanisms for microvascular failure in sepsis include changes in vascular reactivity, endothelial dysfunction, stiff leukocytes and red blood cells, and platelet/fibrin clots (2-6). Results from the present study suggest a novel, yet not demonstrated link, between endothelial glycocalyx disturbances and microvascular perfusion deficit in LPS treated rats. The glycocalyx covers the endothelium and consists of endothelial cell–derived proteoglycans, hyaluronan glycosaminoglycans, and selectively adsorbed plasma proteins (6,7,16-18). From a functional viewpoint, the glycocalyx constitutes the first line of the blood tissue interface and is thus involved in a substantial number of physiological processes, deregulation of which may lead vascular dysfunction (6). These processes include vascular tone, mechano-transduction and transport along vessels (17,18). For example, enzymatic destruction of glycocalyx lining the endothelial surface resulted in a sustained decrease in flow resistance of ~20 percent (20,21). Thickness and hydraulic resistivity of the endothelial glycocalyx are among the principal determinant of organ blood flow (22), red blood cell motion through capillaries (23, 24). By the means of intravital microscopy (8-10), we observed that LPS

treatment elicited profound reduction of endothelial glycocalyx layer thickness. Changes in glycocalyx layer thickness induced by LPS could be related to loss of fluid into the interstitial space, as this layer has been implicated in the control of trans-vascular fluid exchange (6). However, the finding that hyaluronan plasma levels increased in response to LPS treatment also suggests release of glycocalyx constituents into the circulation as a mechanism of glycocalyx thickness reduction. Because endothelial glycocalyx is extremely sensitive to free radical (7,9,17), we next tested whether LPS may elicit oxidative stress at the level of the microvasculature. Based on previously described technique of intravital characterization of small intestine muscularis layer microvascular oxidative stress (19), we observed that LPS consistently induced *in vivo* oxidation of dihydrorhodamine, which suggests free radical generation and potential glycocalyx destruction.

Altogether, our work suggests the contention, yet unproven, that LPS elicits increased vascular oxidative stress which results in blunted vascular response, loss of glycocalyx and capillary perfusion deficit. One of the major limitations of our study is that a causal link destruction of glycocalyx by oxidative stress and microvascular dysfunction was not demonstrated. However, glycocalyx degradation may participate, at least part, in LPS-induced microvascular perfusion deficit. This is supported by experiments showing that enzymatic hyaluronan degradation induces perturbations in capillary perfusion, organ flow distribution and microhemodynamics (20-24). For example, glycocalyx degradation causes significant changes in the distribution of red blood cells in the capillary network leading to decreased in functional capillary density was accompanied by increases in capillary hematocrit of the remaining functional capillaries and in plasma only perfused capillaries (25).

Consistent with previous studies (14,15), activated protein C fully prevented microvascular perfusion deficit in the inflamed microvasculature of LPS treated rats. Activated protein C has been shown to exert cardiovascular effects in sepsis, which include

improvement in arterial blood pressure (26) and sensitivity to the vasoconstrictor agents in endotoxin-induced shock model (27) and clinical sepsis (28). Beneficial effects of activated protein C involve inhibition of diverse molecular mechanisms of inflammation and cellular damage, including those related to overt generation of circulating and locally produced pro-inflammatory mediators, the presence of activated leukocytes and endothelial cell activation (14,15,26). *In vitro* experiments also revealed that activated protein C may exert inhibitory effects on reactive oxygen species generation and lipid peroxidation (29,30). Antioxidant properties of activated protein C could explain, at least part, prevention in glycocalyx degradation and improved capillary perfusion. Excessive oxidative stress may represent a common pathway for sepsis, increasing the probability of developing multiple organ failure and death. Beneficial effects of antioxidant strategies have however yielded conflicting results in various pathological conditions. In sepsis, which is not simply free radical-induced but shows a complex pathophysiology involving many inflammatory and noninflammatory pathways, use of activated protein C with multiple key impacts on the vascular endothelium may be thus particularly attractive.

In conclusion, our study provides the important finding that administration of LPS in rats induces microvascular dysfunction which coincides with increased oxidative stress and loss of endothelial glycocalyx. Given the key location at interface between plasma and endothelial cell, it is likely that glycocalyx plays a fundamental role in the pathogenesis of microvascular dysfunction associated with severe sepsis. Improvement of microvascular function in activated protein C treated LPS rats could be attributed to its inhibitory effects on glycocalyx degradation.

REFERENCES

1. Angus DC, Wax RS: Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:S109-S116.

2. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.

3. Neviere R, Mathieu D, Chagnon JL, et al: Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:191-195.

4. Ellis CG, Jagger J, Sharpe M: The microcirculation as a functional system. *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S3-S8.

5. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.

6. Pries AR, Kuebler WM: Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006;176:1-40.

7. Taylor KR, Gallo RL: Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006;20:9-22.

8. Vink H, Duling BR: Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996;79:581-589.

9. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR: Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 2006;290:H2247-H2256.

10. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, et al: Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006;55:1127-1132.

11. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA: Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1541-1547.

12. Abraham E, Laterre PF, Garg R, etal: Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med* 2005;353:1332-1341.

13. 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.

14. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al: Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32:1011-1017.

15. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, et al: Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med* 2005;33:368-372.

16. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, et al: Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med* 2006;259:393-400.

17. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P: The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000;440:653-666.

18. Tarbell JM, Pahakis MY: Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 2006;259:339-350.

19. Han JY, Miura S, Akiba Y, et al: Chronic ethanol consumption exacerbates microcirculatory damage in rat mesentery after reperfusion. *Am J Physiol* 2001;280:G939-48.

20. Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, et al: Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol* 1997;273:H2272-H2279.

21. Pries AR, Schonfeld D, Gaehtgens P, et al: Diameter variability and microvascular flow resistance. *Am J Physiol* 1997;272:H2716-H2725.

22. Vogel J, Sperandio M, Pries AR, et al: Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1571-1578.

23. Secomb TW, Hsu R, Pries AR: A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. *Am J Physiol* 1998;274:H1016-H1022.

24. Damiano ER: The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvasc Res* 1998;55:77-91.

25. Cabrales P, Salazar Vazquez BY, Tsai AG, Intaglietta M. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J Appl Physiol* 2007 Mar 8; [Epub ahead of print]

26. Favory R, Lancel S, Marechal X, et al: Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive Care Med* 2006;32:899-905.

27. Wiel E, Costecalde ME, Lebuffe G, et al: Activated protein C increases sensitivity to vasoconstriction in rabbit Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Crit Care* 2006;10:R47.

28. 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;31:1573-1576.

29. 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;115:319-25.

30. Dillon JP, Laing AJ, Cahill RA, et al: Activated protein C attenuates acute ischaemia reperfusion injury in skeletal muscle. *J Orthop Res* 2005 23:1454-9.

Table 1: Functional capillary density of the muscularis layer of the small intestine.

	CD cont (%)	CD int (%)	CD stop (%)
Control	88 ± 5	10 ± 6	2 ± 1
Control APC	80 ± 8	10 ± 5	5 ± 7
LPS	55 ± 7 *	15 ± 2 *	25 ± 8 *
LPS APC	76 ± 3	10 ± 2 *	6 ± 14

Functional density results fore the different flow rates were ewpressed as percentage of total functional capillary density (CD) Capillaries were classified over a 30-s time interval as being either, 1) continuous (cont), 2) intermittent (int), or 3) stopped (stop). Results are expressed as mean ± SEM (n = 8 in each group). * indicates P<0.05 compared to controls. See Materials and Methods for treatment group design.

Figure 1

Changes in mean systemic arterial pressure induced by the administration of norepinephrine NE (0.1 to 1 µg/kg) (panel A) and acetylcholine (0.01 to 1 µg/kg) (panel B) in control, control-activated protein C (APC), LPS and LPS- APC anesthetized rats. Changes in plasma epinephrine and norepinephrine concentrations (4hours after treatment) in control, control-activated protein C (APC), LPS and LPS-APC anesthetized rats are displayed panel C. Results are expressed as mean ± SEM (n = 8 in each group); * indicates P<0.05 compared to controls; † indicates P<0.05 compared to LPS (one-way ANOVA).

Figure 2

A: Photographs correspond to 3 different rats taken 4 hours after treatment in control, control-activated protein C (APC), LPS and LPS-APC. DHR 123 fluorescence increases were observed in capillaries of small intestine longitudinal muscle layer. Semiquantitative analysis revealed that DHR 123 fluorescence intensity was 150 ± 25 arbitrary units a.u. in controls, 5000 ± 500 a.u. in LPS and 1000 ± 80 a.u. in LPS-APC treated rats.

B and C: Changes in small intestine malondialdehyde MDA and plasma carbonyl protein concentrations (4hours after treatment) in control, control-activated protein C (APC), LPS and LPS-APC anesthetized rats. Results are expressed as mean ± SEM (n = 8 in each group); * indicates P<0.05 compared to controls (one-way ANOVA).

Figure 3

A: Digitized images of a capillary segment after 150 and 4 kD FITC-dextran infusion. Width of the FITC-dextran column was significantly smaller in 150 kD FITC-dextran than 4 kD FITC-dextran. Scale bar in the lower and bottom panels represents 4.7 and 5.4 µm, respectively.

B and C: Apparent thickness of endothelial exclusion zone and plasma hyaluronan concentrations (4hours after treatment) in control, control-activated protein C (APC), LPS and LPS-APC anesthetized rats. Results are expressed as mean ± SEM (n = 8 in each group); * indicates P<0.05 compared to controls.

Figure 1

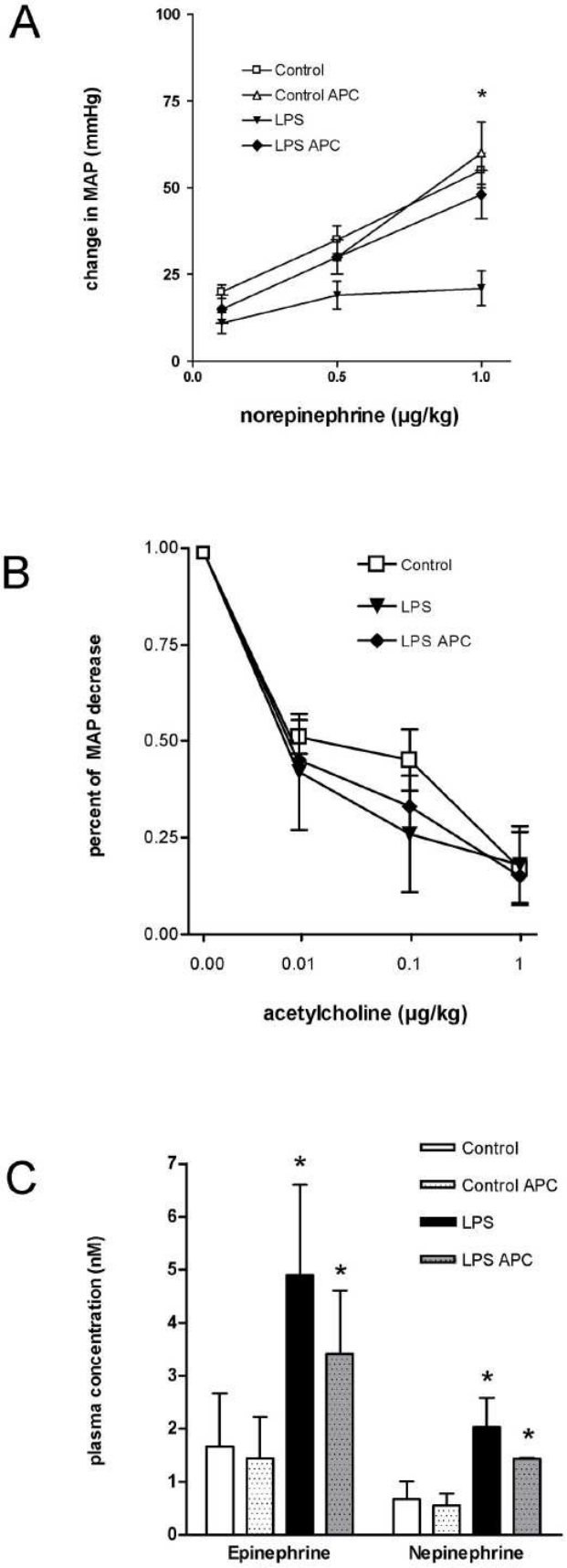

A
100
75
50
25
0
change in MAP (mmHg)
Control
Control APC
LPS
LPS APC
*
0.0
0.5
1.0
norepinephrine (µg/kg)
B
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
percent of MAP decrease
Control
LPS
LPS APC
0.00
0.01
0.1
1
acetylcholine (µg/kg)
C
7
6
5
4
3
2
1
0
plasma concentration (nM)
Control
Control APC
LPS
LPS APC
*
*
*
*
Epinephrine
Nepinephrine

Figure 2

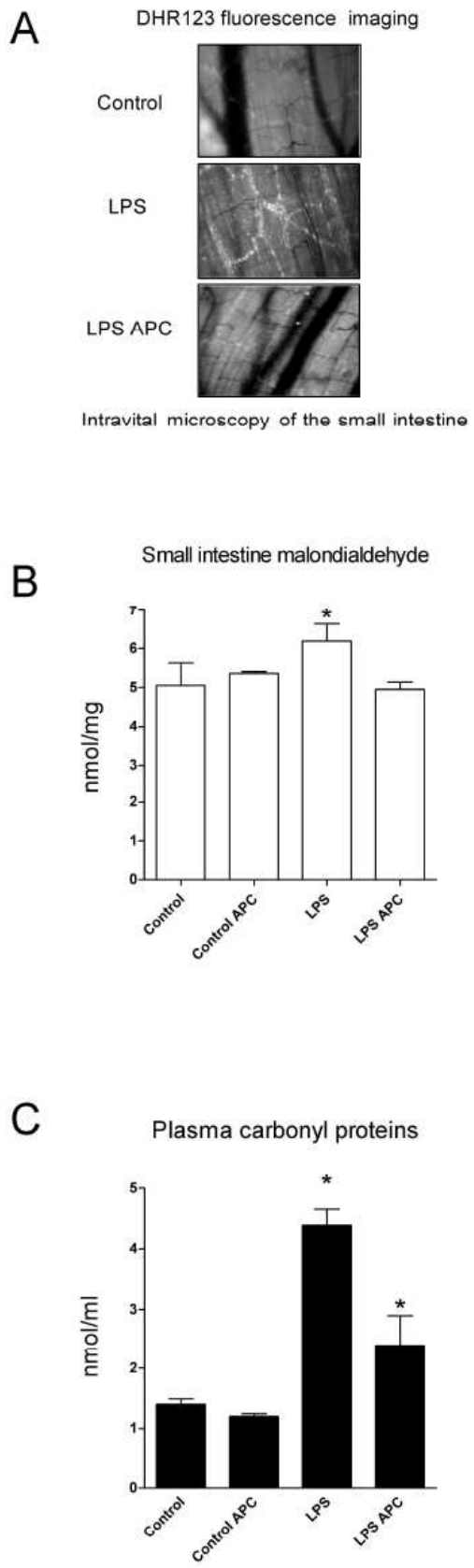
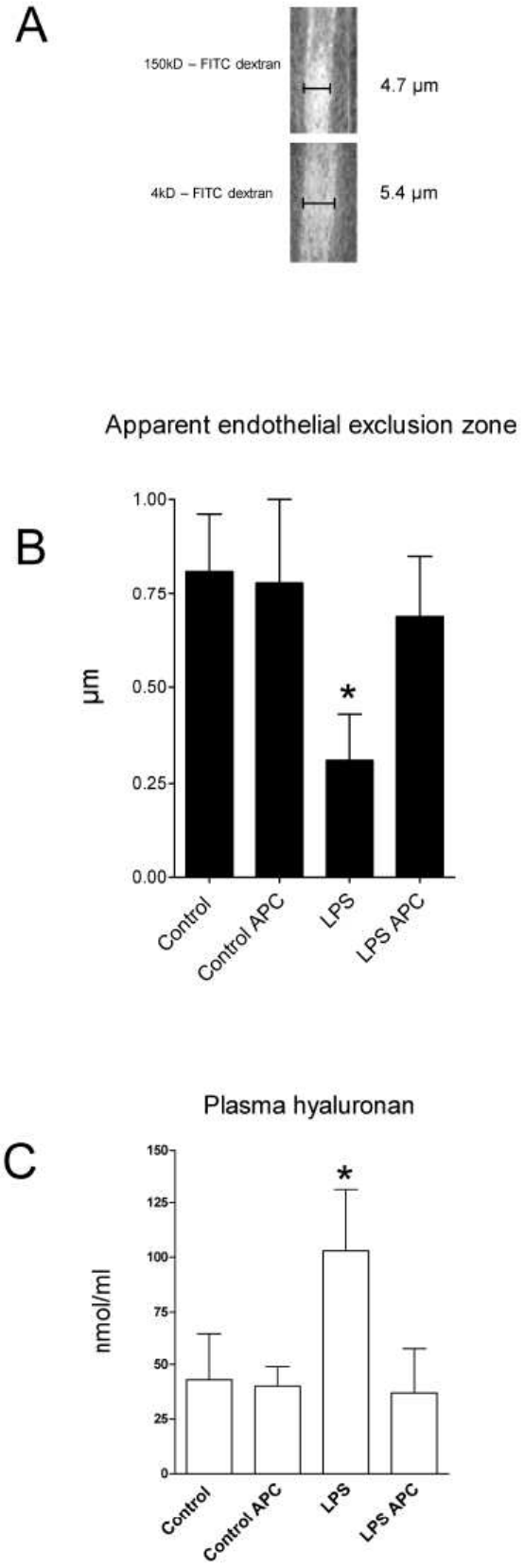

A
DHR123 fluorescence imaging
Control
LPS
LPS APC
Intravital microscopy of the small intestine
B
Small intestine malondialdehyde
nmol/mg
0
1
2
3
4
5
6
7
*
Control
Control APC
LPS
LPS APC
C
Plasma carbonyl proteins
nmol/ml
0
1
2
3
4
5
*
*
Control
Control APC
LPS
LPS APC

Figure 3


A
150kD – FITC dextran
4.7 µm
4kD – FITC dextran
5.4 µm
Apparent endothelial exclusion zone
B
µm
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
Control
Control APC
LPS
LPS APC
Plasma hyaluronan
C
nmol/ml
150
125
100
75
50
25
0
*
Control
Control APC
LPS
LPS APC

Article n°4

La dysfonction contractile cardiaque induite par l'endotoxine est attribuée en partie aux effets des cytokines proinflammatoires telles le TNF-α. Le TNF-α, seul ou en association avec l'IL-1β, est capable de reproduire in vivo et in vitro l'anomalie contractile cardiaque. L'équipe d'Oral a pu montrer que cet effet dépresseur du TNF-α s'accompagnait d'une production accrue en sphingosines, molécules induisant l'apoptose dans de nombreux modèles. Le but de notre travail consiste à évaluer l'implication de ces molécules proapoptotiques dans la dépression cardiaque septique.

Pour cela, nous avons injecté en IV à des rats de l'endotoxine avec ou sans NOE (N-oleoylethanolamine), un inhibiteur des céramidases. Quatre heures après l'induction du choc endotoxinique, les rats sont sacrifiés et les performances contractiles cardiaques ont été mesurées sur colonne de Langendorff. Dans une autre série d'expériences, des cœurs d'animaux non traités ont été perfusés ex vivo par un tampon physiologique contenant de l'endotoxine (5µg/mL), en présence ou non de NOE (1 µmol/L). La fonction cardiaque a été évaluée sur colonne de Langendorff. Enfin sur des cardiomyocytes isolés de cœurs de rats adultes, les effets directs de la sphingosine (20 ou 30 µmol/L) sur la fraction de raccourcissement, les transitoires calciques, le potentiel de membrane mitochondrial, la libération de cytochrome c et l'activité des caspases-9 et -3 ont été appréciés.

Les rats traités par l'endotoxine et le NOE *in vivo* voient leurs performances cardiaques supérieures à celles de rats traités par l'endotoxine seule. *Ex vivo*, la dépression cardiaque induite par la perfusion d'endotoxine est prévenue par le NOE. En outre, cette dysfonction cardiaque semble être corrélée à la production de TNF-α. *In vitro*, la sphingosine réduit la fraction de raccourcissement des cardiomyocytes, les transitoires calciques ainsi que le potentiel membranaire mitochondrial. La sphingosine provoque en outre une libération de cytochrome c depuis les mitochondries vers le cytosol et une augmentation des activités caspases-9 et -3.

Ces résultats suggèrent une implication forte des sphingosines dans la dysfonction myocardique septique et esquissent un rôle pour le potentiel de membrane mitochondrial dans cette dysfonction.

Endotoxin-induced myocardial dysfunction: Evidence for a role of sphingosine production*

Raphael Favory, MD; Steve Lancel; Philippe Marchetti, MD, PhD; Serge Mordon, PhD; Claude Chopin, MD; Pierre Formstecher, MD, PhD; Remi Neviere, MD, PhD

Objective: **To determine whether sphingomyelinase pathway activation would participate in myocardial depression induced by endotoxin.**

Design: **Randomized, controlled trial.**

Setting: **Experimental laboratory.**

Subjects: **Male Sprague-Dawley rats, isolated rat heart, and cardiac myocytes.**

Interventions: **Cardiovascular function was evaluated in rats injected with saline, endotoxin (10 mg/kg, intravenously), and N-oleoylethanolamine (NOE; 10 mg/kg, intravenously). In *ex vivo* experiments, isolated rat hearts were perfused with endotoxin (5 μg/mL). For pharmacologic intervention, NOE (1 μmol/L) was admixed to the perfusate 20 mins before endotoxin. In *in vitro* experiments, ventricular myocytes were incubated with sphingosine (20 μM). Myocyte cell shortening and calcium transient were measured. Mitochondrial membrane potential was measured using the cationic dye tetramethylrhodamine methylester fluorescence technique.**

Measurements and Main Results: **Endotoxin treatment at 4 hrs did not alter mean arterial pressure and abdominal blood flow compared with control rats. Left ventricle developed pressure (LVDP) and its first derivatives (i.e., maximal and minimal change in pressure over time [dP/dt_{max} and dP/dt_{min}]) were decreased after 4 hrs in endotoxin-treated rats compared with control rats. NOE (10 mg/kg) treatment largely prevented left ventricular systolic function alterations of endotoxin-treated hearts (n = 6 in each group). In isolated rat heart, endotoxin (5 μg/mL) caused increases in tumor necrosis factor-α perfusate concentration and delayed depression of LVDP, dP/dt_{max}, and dP/dt_{min} after 60 mins, which was partially abrogated in the presence of the ceramidase inhibitor NOE (1 μmol/L). Sphingosine (20 μM) caused decreases in cell fractional shortening, calcium transient, and mitochondrial membrane potential of cardiac myocytes.**

Conclusion: **These observations suggest that the sphingomyelinase pathway participates in endotoxin-induced myocardial depression. (Crit Care Med 2004; 32:495–501)**

Key Words: shock; endotoxin; heart failure; cardiomyocyte; mitochondria; sphingosine

Despite numerous advances in medical treatment, the mortality rate of sepsis continues to exceed 40% (1). Bacterial endotoxins, glycolipid lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria, are important pathogenic factors in sepsis and mimic the cardiac depression of septic shock in human volunteers (1, 2) or experimental animals (3). The release of endotoxins into the circulation activates a series of tissue responses that in their most severe forms lead to cardiovascular failure and death (4, 5). Most of the endotoxin-induced myocardial contractile dysfunction has been attributed to the effects of proinflammatory cytokines on the heart (6, 7). Tumor necrosis factor (TNF)-α, alone or in association with interleukin (IL)-1β, may induce cardiac depression in myocytes *in vitro* (7) and in instrumented hearts *in vivo* (8, 9). Overproduction of TNF-α represents one of the most critical factors for the development of myocardial depression in clinical and experimental sepsis (4, 6, 7, 10). Despite evidence that TNF-α plays a pivotal role in endotoxin-induced myocardial dysfunction, the mechanisms by which this pleiotropic cytokine alters cardiac mechanical function remain unclear (9, 10).

The negative inotropic effects of TNF-α have been attributed to enhanced synthesis of nitric oxide (11–13). Proposed mechanisms of nitric oxide-induced myocardial depression include calcium transient alterations (14, 15), desensitization of β-receptors (16), and inhibition of mitochondrial function (17, 18). As a different concept, part of the depressant myocardial effects of TNF-α were attributed to increased production of sphingosine. Indeed, following endotoxin and TNF-α exposure, the activation of the neutral sphingomyelinase pathway increases sphingosine production in the heart via sphingomyelin degradation after the intermediate formation of ceramide (19). At the cellular level, increased sphingosine production may in turn inhibit sarcoplasmic calcium release and decrease myocyte calcium transients and shortening in cultured myocytes (19–21). In isolated heart preparation, sphingosine has been shown to exert some of the acute deleterious effects attributed to endotoxin and TNF-α, including coronary vasoconstriction and negative inotropy (8, 9, 22). In human sepsis, increases in mononuclear cell ceramide concentration predicted multiple organ

*See also p. 609.

From EA 2689 (RF, SM, CC, RN), Pavillon Vancostenobel, Université de Lille 2, Faculté de Médecine Lille, France; and Département de Physiologie (RF, RN) and INSERM U459 (SL, PM, PF), Faculté de Médecine 1, Place Verdun, 59045 Lille, France.

Supported, in part, by Bourse 2002 de la Société de Réanimation de Langue Francaise SRLF, Paris, France, and Bourse 2001 (ET1–306) de la Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale, Paris, France.

Address requests for reprints to: Remi Neviere, MD, PhD, Département de Physiologie, Faculté de Médecine 1, Place Verdun, Lille Cedex, 59045 France F-59045 Lille Cedex, France. E-mail: rneviere@univ-lille2.fr

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000109452.36271.FA

dysfunction, including cardiovascular failure, and outcome (23).

Inhibition of sphingosine production by the ceramidase inhibitor N-oleoylethanolamine (NOE) emerged as a valid concept as NOE reversed the immediate negative inotropic effects of TNF-α in myocyte cultures (19), myocardial trabeculae (6), and *ex vivo* heart (8, 9). *In vivo* effects of NOE in endotoxin-induced myocardial dysfunction have not been previously reported. Also, the biological effects of sphingosine on contractile and mitochondrial function have not been investigated extensively in ventricular myocytes. The general purpose of this study was to investigate the implication of sphingolipid metabolites in myocardial depression induced by endotoxin in rats. Specifically, the major objectives of this study were two-fold. First, we tested whether inhibition of sphingosine production by the ceramidase inhibitor NOE would prevent myocardial dysfunction induced by endotoxin *in vivo* in rats and *ex vivo* in isolated rat hearts. Second, we studied the effects of sphingosine exposure on contractile function and mitochondrial membrane potential in rat ventricular myocytes.

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation

Adult male Sprague-Dawley rats (250–300 g; Dépré, Saint Doulchard, France) were housed for 6 days in groups of six in standard cages. Rats were housed in a controlled environment and provided with standard rodent chow and free tap water. Treatments were administered intravenously, via the dorsal penine vein, after brief ether anesthesia. Four groups of rats were prepared. Control rats were injected with 500 μL of saline intravenously. Endotoxin-treated rats were injected with 10 mg/kg endotoxin from *Escherichia coli* serotype 055:B5 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) in 500 μL of saline. NOE-treated control rats were injected with 10 mg/kg NOE (Sigma Chemical, St. Quentin Fallavier, France) dissolved in 500 μL of saline. Endotoxin NOE-treated rats received 10 mg/kg NOE plus 10 mg/kg endotoxin dissolved in 500 μL of saline. All experiments were conducted in accordance with our national guidelines for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was reviewed and approved by our local animal care committee.

Assessment of Cardiovascular Function

Four hours after rat preparation, mean systemic arterial pressure and abdominal blood flow were assessed. After pentobarbital sodium anesthesia (65 mg/kg intraperitoneally), rats were instrumented with an arterial catheter advanced in the right carotid and with an electromagnetic perivascular blood flow probe (99020, Skalar Medical, Delft, The Netherlands) placed around the subrenal abdominal aorta. Mean arterial pressure was recorded using a Biopac Data Acquisition System (Biopac Systems, Goleta, CA). Mean abdominal blood flow was recorded using a electromagnetic blood flow meter (MDL 1401, Skalar Medical, Delft, The Netherlands).

Four hours after rat preparation, hearts were isolated and *ex vivo* myocardial contractile function was studied using a modified Langendorff preparation as previously described (24). Following heparinization and ether anesthesia, the heart was rapidly excised and placed into ice-cold Krebs-Henseleit buffer solution. Then the heart was mounted onto a Langendorff heart perfusion apparatus and perfused in a retrograde fashion via the aorta at a constant flow rate of 10 mL/min with aerated (95% oxygen, 5% CO_2) Krebs-Henseleit buffer. The final buffer pH was 7.37–7.42, partial pressure of oxygen was 550–600 mm Hg, partial pressure of carbon dioxide was 40 mm Hg, and temperature was maintained at 37°C. Cardiac contractile function was assessed using a water-filled latex balloon inserted into the left ventricular (LV) cavity and connected to a pressure transducer (Baxter-Edwards Critical Care, Irvine, CA). The heart was paced at 300 beats/min and allowed to equilibrate for 30 mins. LV end-diastolic pressure was adjusted to 4–5 mm Hg by increasing the balloon volume with a micrometer-filled syringe. Left ventricular developed pressure (LVDP), its first derivatives (maximal and minimal change in pressure over time [dP/dt_{max} and dP/dt_{min}]), and coronary perfusion pressure (CPP) were recorded using a Biopac Data Acquisition System (Biopac Systems).

Measurement of TNF-α Concentration

TNF-α concentrations were determined in the perfusate of isolated hearts. Samples (0.5 mL) were collected from the heart perfusate each 30 mins and stored frozen at −80°C until analysis. TNF-α concentrations were performed by the use of commercial immunoassay kit (enzyme-linked immunosorbent assay) specific for rat cytokine TNF-α (Quantitine M rat, R&D Systems, Abingdon, Oxford, UK). Reading was performed in a microplate reader (Spectracount, Packard Instruments, Meriden, CT).

Assessment of Ventricular Myocyte Contractile Function

Ventriculocyte Isolation Procedures. Following heparinization and ether anesthesia, calcium-tolerant ventricular myocytes were isolated by cardiac retrograde aortic perfusion as previously described (14). To isolate ventricular myocytes, hearts were perfused through the aorta for 10 mins with calcium-free buffer (buffer A) after which the buffer was changed to one containing 1 mg/mL collagenase B (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.1 mg/mL protease type XIV (Sigma Chemical, St. Quentin Fallavier, France). The heart was perfused for 20 mins in a recirculating manner with the collagenase solution. The collagenase solution then was washed out for 2 mins with buffer A containing 0.2 mM $CaCl_2$. The heart was removed from the perfusion cannula and chopped with scissors in 15 mL of buffer containing 0.2 mM $CaCl_2$ and 25 mM KCl. The tissue was incubated at 37°C for 15 mins and filtered through a 250-mesh nylon screen, and the filtrate was centrifuged gently for 45 secs. Calcium buffer was progressively increased to 1.8 mM in M199 (Sigma Chemical, M199 M4530, St. Quentin Fallavier, France). The cells were diluted to a concentration of approximately 100,000 cells/mL made up to 3 mL in Petri dishes. Cells were transferred on the thermoregulated (30°C) stage of a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Paris, France). Cells were allowed to stabilize for 30 mins before pacing. During measurements, cells were field-stimulated with bipolar platinum electrodes with pulses of 5 msecs duration at a frequency of 1 Hz using a stimulator (Grass S48, Grass Instrument Division, Astro-Med, Trappes, France). Voltage was set at 4 V above threshold (25–30 V).

Myocyte Cell Shortening. Mechanical properties of ventricular myocytes were assessed by use of a video-based edge-detection system (IonOptix Digital Edge Detection Software Iwizrd, IonOptix, Milton, MA). The myocyte being studied was displayed on the computer monitor with the use of an IonOptix MyoCam camera, which rapidly scans the image area at every 8.3 msecs such that the amplitude and velocity of shortening/relengthening are recorded with good fidelity. The soft-edge software (IonOptix Digital Edge Detection Software Iwizrd) was used to capture changes in cell length during shortening and relengthening. Data were expressed as percent of shortening of individual cell.

Myocyte Calcium Transient. Intracellular calcium transients in isolated contracting myocytes were evaluated using the fluorescent indicator fluo-3, as previously described (14). After 20 mins of loading with fluo-3 (7.5 μM), the cells were washed to remove any unincorporated dye and then placed in Petri dishes on the stage of Nikon E800 microscope. Fluorescence brightness (excitation light 465–495, emission light 515–555) was recorded at base-

line and during the myocyte contraction sequences using a video-camera Hamamatsu C2400-08 (Hamamatsu City, Japan) mounted on the microscope, which projected the image onto a monitor. Excitation light intensity was set to 15 W (Ophir Laserstar, Optilas Composants, Evry, France). Images (720 × 576 pixels) were recorded for playback analysis with digital video cassette recorder Sony DVR 30 (Sony, Paris, France). Fluorescence brightness was determined for a single myocyte contraction by measuring the total fluorescence intensity over the surface area of individual cell. Data were expressed as changes in total cellular fluorescence brightness from baseline values.

Assessment of Mitochondrial Membrane Potential

Numerous types of probes have been used to estimate the electrical potential across the inner mitochondrial membrane (25, 26). In many cases, the distribution of the free dye across the inner membrane has been shown to follow the Nernst equation. However, many of these probes exhibit significant binding to mitochondria that complicates their use for accurate quantification of membrane potential and alters mitochondrial function (25). In the present study, we used the cationic dye tetramethylrhodamine methylester (TMRM, Molecular Probes, Eugene, OR) to monitor mitochondrial membrane potential in myocytes (26). TMRM binds to the inner and outer aspects of the mitochondrial membrane and, as a result, is accumulated by mitochondria in a greater quantity than predicted by the Nernst equation. However, a low concentration of TMRM has been shown to actually monitor membrane potential with minimal mitochondria binding and minimal effects on mitochondrial respiration (26).

Freshly isolated myocytes were incubated with 50 nM TMRM for ≥15 mins in 37°C M199 medium. Coverslips with noncontracting cells were observed using confocal microscopy (Leica TCS NT, Leica Microsystemes, Laser Argon-Krypton excitation 488, 568 and 647 nm, Rueil Malmaison, France). Subsequently, sequential digital images were obtained, and the average fluorescence intensity for all of the cell regions and background was recorded for later analysis. TMRM fluorescence intensity was reported as the average of the fluorescence of all identified cell regions, less background, for each coverslip. At the end of the study, the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, which would be expected to rapidly dissipate the mitochondrial electrochemical gradient, was added (10 μM). As predicted, addition of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (10 μM) to the cell medium produced a rapid and marked decrease in fluorescence indicating a loss of potential of the probe.

Experimental Protocols

In the first series of experiments, control rats, endotoxin-treated rats, NOE-treated control rats, and NOE-treated endotoxin-treated rats were prepared. Endotoxin and NOE dose regimens were based on previously published studies (24, 27). Four hours after treatment, cardiovascular function was studied *in vivo* and *ex vivo* using an isolated and perfused heart preparation in a nonrecirculating system. Six rats in each group were studied.

In the second series of experiments, hearts of control rats were perfused in a nonrecirculating system for 30 mins. Hearts that developed a systolic pressure <70 mm Hg after stabilization were discarded. Hearts then were switched to a recirculating perfusion mode (total volume 200 mL) with endotoxin (5 μg/mL). In some experiments, endotoxin was omitted. For pharmacologic intervention, NOE (1 μmol/L) was admixed to the perfusate 20 mins before endotoxin to allow equilibration. Myocardial function then was studied over time. Perfusate concentration of endotoxin and NOE was selected according to previously published studies (8, 9, 28). The reason for recirculating the Krebs buffer was to reduce the amount of endotoxin used during each experiment, as well as to allow the buildup of possible metabolites released by endotoxin. Six hearts were evaluated in each group.

In the third series of experiments, control myocytes were incubated with sphingosine (20 and 30 μM). Myocyte contractile cell motion and mitochondrial membrane potential were studied over time. Myocyte calcium transients were studied 120 mins after sphingosine (20 μM) exposure. A total of 30 cells were evaluated in each experimental condition. Twelve rats were used to isolate cardiac myocytes and to perform the described *in vitro* experiments.

Statistical Analysis

For *in vitro* and *in vivo* studies, results were compared by two-way (time and group) analysis of variance procedures for repeated measurements (SPSS for Windows 9.0, SPSS France, Paris). When a significant difference was found, we identified specific differences between groups using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of Bonferroni correction, significance was achieved with $p < .01$ for comparisons with control. Data are presented as means ± SEM throughout.

RESULTS

NOE Alters Endotoxin-Induced Cardiovascular Dysfunction

Measurements of mean arterial pressure and abdominal blood flow were similar in control rats, NOE-treated control rats, endotoxin-treated rats, and endotoxin NOE-treated rats (n = 6 in each group; Table 1). As shown in Table 2, LVDP and its first derivatives (i.e., dP/dt_{max} and dP/dt_{min}) were significantly decreased 4 hrs after administration of endotoxin compared with control animals. Coinjection of NOE (10 mg/kg) largely prevented LV systolic function alterations of endotoxin-treated hearts (n = 6 in each group; Table 2). Compared with control animals, CPP was increased in endotoxin-treated rats, which was not altered by injection of NOE (Table 2).

Effects of Endotoxin and NOE on Contractile Function of Isolated Rat Hearts

LVDP and its first derivatives (i.e., dP/dt_{max} and dP/dt_{min}) of control hearts remained stable throughout the perfusion period (Fig. 1). NOE (1 μmol/L) had no effects on control hearts over time. Administration of endotoxin to the recirculating perfusate (5 μg/mL) caused a delayed depression of LVDP, dP/dt_{max}, and dP/dt_{min} after 60 mins, which further progressed until terminating the experiments. Significant increases in CPP were observed over time. The endotoxin-induced cardiodepression and CPP increases were not prevented in the presence of NOE into the perfusate (Fig. 1).

Concentrations of TNF-α into perfusate increased in isolated hearts when endotoxin was admixed to the perfusate Krebs-Henseleit buffer (Fig. 2).

Effects of Sphingosine on Myocyte Contractile and Calcium Transient

The contractile response to sphingosine was studied in cultured ventricu-

Table 1. Mean systemic arterial pressure (MAP) and abdominal blood flow (ABF) in control rats (control), N-oleoylethanolamine (NOE)-treated control rats (control-NOE), endotoxin (LPS)-treated rats (LPS) and NOE endotoxin-treated rats (LPS-NOE) at 4 hrs

	MAP, mm Hg	ABF, mL/min
Control	103 ± 5	46 ± 5
Control—NOE	105 ± 2	44 ± 5
LPS	95 ± 8	42 ± 8
LPS—NOE	100 ± 2	46 ± 6

Results are expressed as mean ± SEM ($n = 6$ in each group).

Table 2. Assessment of myocardial function using an isolated and perfused heart preparation in control rats (control), N-oleoylethanolamine (NOE)-treated control rats (control-NOE), endotoxin (LPS)-treated rats (LPS) and NOE endotoxin-treated rats (LPS-NOE) at 4 hrs

	LVDP, mm Hg	CPP, mm Hg	dP/dt_{max}, mm Hg/sec	dP/dt_{min}, mm Hg/sec
Control	85 ± 5	42 ± 6	3600 ± 180	3050 ± 110
Control—NOE	80 ± 2	40 ± 5	3000 ± 180	3040 ± 150
LPS	50 ± 7[a]	55 ± 8[a]	1800 ± 250[a]	1150 ± 130[a]
LPS—NOE	81 ± 3[b]	61 ± 2[a]	3450 ± 140[b]	2900 ± 150[b]

LVDP, left ventricular developed pressure; CPP, coronary perfusion pressure; dP/dt_{max}, maximum rate of LV pressure rise; dP/dt_{min}, maximum rate of LV pressure fall.

[a]$p < .01$ compared with control; [b]$p < .01$ compared with LPS. Results are expressed as mean ± SEM ($n = 6$ in each group).

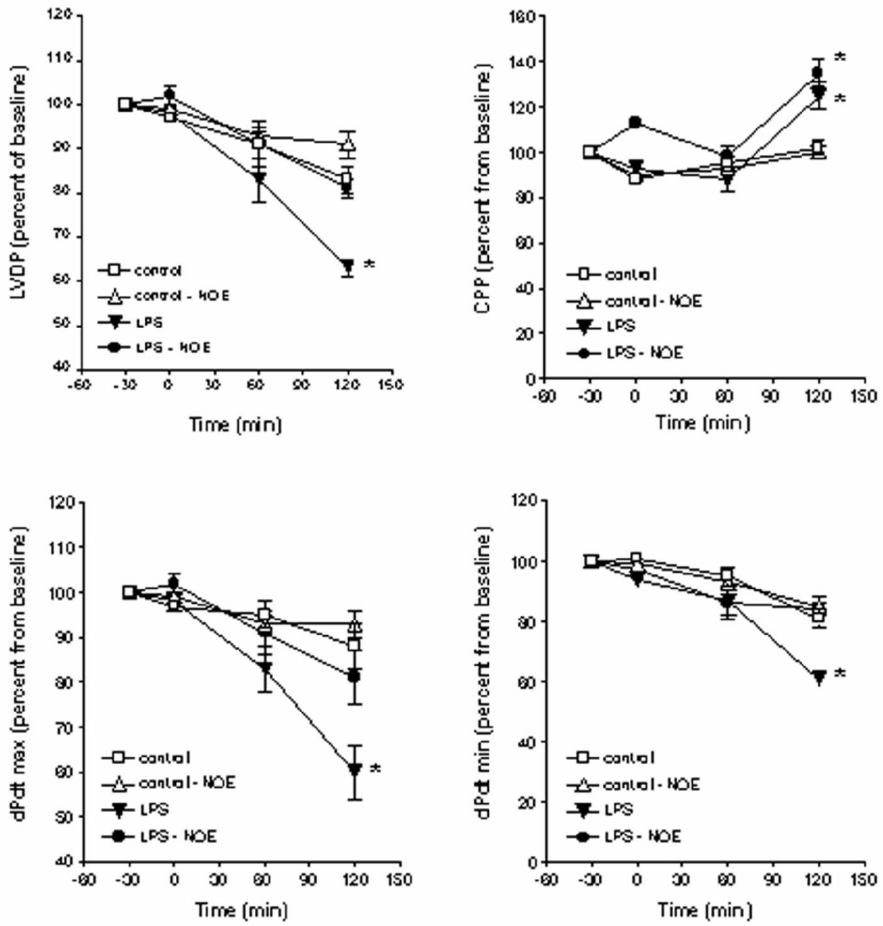


Figure 1. Effects of endotoxin (5 μg/mL) on left ventricular developed pressure (*LVDP*), maximum rate of left ventricular pressure increase (dP/dt_{max}), maximum rate of left ventricular pressure decrease (dP/dt_{min}), and coronary perfusion pressure (*CPP*) in isolated heart subjected to nonrecirculating (baseline) and recirculating perfusion with and without N-oleoylethanolamine (*NOE*; 1 μmol/L) over time (120 mins). Control hearts were perfused without endotoxin. NOE (1 μmol/L) had no effects in control hearts over time. Results are expressed as mean ± SEM (n = 6 in each group). *$p < .01$ compared with control. See Materials and Methods for treatment group design. *LPS*, lipopolysaccharide.

lar myocytes. Isolated myocyte fractional shortening of control hearts remained stable throughout the study period (Fig. 3). Addition of sphingosine (20 and 30 μM) in cell medium caused a reduction of myocyte fractional shortening after 120 mins, which further progressed until terminating the experiments (Fig. 3). Sphingosine (20 μM) caused a 53% decrease in total fluo-3 fluorescence intensity at 120 mins, which was used to assess myocyte calcium transient.

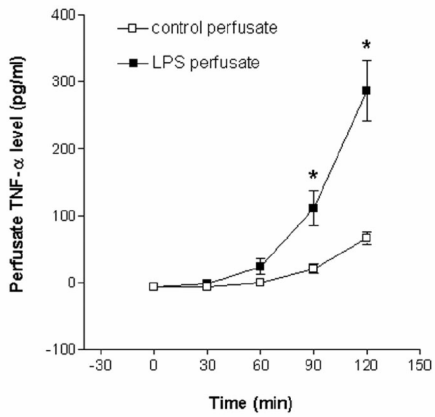


Figure 2. Effects of endotoxin (5 μg/mL) on tumor necrosis factor (*TNF*)-α concentration into isolated heart perfusate. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3 in each group). *$p < .01$ compared with control perfusate. See Materials and Methods for treatment group design. *LPS*, lipopolysaccharide.

Effects of Sphingosine on Mitochondrial Membrane Potential

In control conditions, TMRM fluorescence intensity in noncontracting cells was unchanged over time. Addition of sphingosine (20 μM) to cell medium was associated with acute decreases in TMRM fluorescence intensity (15 mins), which suggested that mitochondrial membrane potential was decreased (Fig. 4*A*). Over time, TMRM fluorescence intensity remained lower in sphingosine-treated myocytes compared with control myocytes (Fig. 4*B*). Addition of the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (10 μM) to the cell medium produced a rapid and marked decrease in fluorescence, indicating a loss of potential of the probe.

DISCUSSION

Our findings indicate that a) endotoxin induced myocardial depression both *in vivo* and *ex vivo*, which was prevented in part by NOE, a ceramidase inhibitor; and b) sphingosine, a breakdown metabolite of neutral sphingomyelinase pathway, induced ventricular myocyte contractile and mitochondrial membrane potential dissipation, which may participate in septic myocardial depression.

In response to various extracellular stimulation, the generation of sphingo-

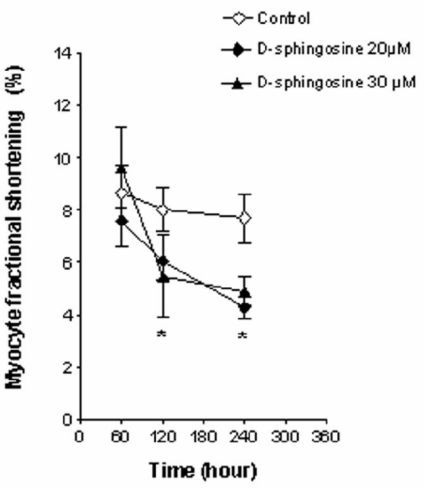


Figure 3. Effects of sphingosine (20 and 30 μmol/L) on isolated ventricular myocyte fractional shortening over time. Results are expressed as mean ± SEM (n = 30 cells in each group). *$p < .01$ compared with control. See Materials and Methods for treatment group design.

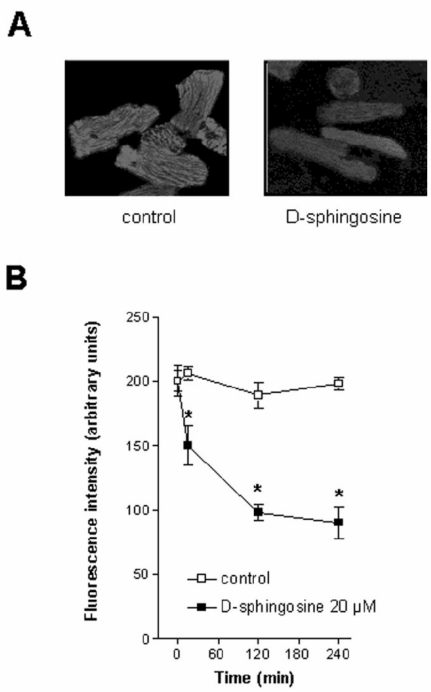


Figure 4. The mitochondrial membrane potential was evaluated as myocyte tetramethylrhodamine ethylester (TMRM) fluorescence intensity. *A*, representative confocal photomicrographs of ventricular myocytes incubated with 50 nM TMRM. *B*, sphingosine (20 μM) induced a time-dependent reduction in TMRM fluorescence intensity. Results are expressed as mean ± SEM (n = 30 cells in each group). *$p < .01$ compared with control. See Materials and Methods for experimental design.

lipid molecules such as sphingosine, ceramide, and sphingosine-1-phosphate is followed by regulation of ion fluxes and activation of various signaling pathways leading to apoptosis, cell proliferation, cell differentiation, and cell contraction and migration (29). In cardiovascular signaling, sphingolipid metabolites, particularly sphingosine, ceramide, and sphingosine-1-phosphate, often have opposing biological effects (19, 29). Free sphingosine production following cytokine stimulation is sufficient to completely mimic the negative inotropic effects of TNF-α (19). In contrast, ceramide, the immediate precursor of sphingosine, is neither necessary nor sufficient to mimic the negative effects of TNF-α (19). Sphingosine 1-P, the phosphorylated metabolite of sphingosine, preserves cardiac contractile function and coronary perfusion following myocardial ischemia and reperfusion (30). The specific objective of our study was to focus on the role of sphingosine in mediating myocardial function induced by endotoxin administration in rats.

Endotoxemia at 4 hrs did not alter mean systemic arterial pressure and abdominal aortic blood flow. However, a significant problem in *in vivo* studies of cardiac function is that indirect effects of sepsis on coronary perfusion pressure, preload, afterload, heart rate, and interaction of the heart with surrounding structures may confound measures of ventricular systolic performance and contractility (3, 31). We used an *ex vivo* modified Langendorff heart preparation to evaluate intrinsic cardiac contractility (24). We observed that heart isolated from rats treated with endotoxin had reduced contractility-derived variables that suggest early-onset myocardial depression (24, 31).

We found that ceramidase inhibitor NOE treatment ameliorated endotoxin-induced myocardial dysfunction, which was not related to coronary perfusion improvement. In a model of coronary microembolization in dogs, NOE infusion also abolished proinflammatory cytokine-induced contractile dysfunction (27). Additional evidence for a role of sphingosine production in endotoxin-induced myocardial dysfunction was obtained from isolated hearts perfused. First, in isolated heart, addition of endotoxin into the perfusate reduced time-dependent myocardial function, which was associated with increases in coronary perfusion pressure. Endotoxin induced rapid TNF-α concentration increases (28), which may contribute to coronary vasoconstriction. The effects of TNF-α on coronary tone in isolated heart preparation appeared to be mediated by the vasoconstrictor prostanoid thromboxane A2 (8). Second, we observed that endotoxin induced ventricular contractility decreases that were prevented, in part, by the presence of NOE in the perfusate. These observations are consistent with studies showing some beneficial effects of NOE treatment in myocardial dysfunction induced by endotoxin (22) and TNF-α (8, 9) in isolated heart preparations. Also, endotoxin admixed to the perfusate induced rapid increases in coronary perfusion pressure, which was not prevented by NOE. These observations suggest that the beneficial inotropic effects of NOE were rather related to changes in cardiomyocyte cell function than changes in coronary hemodynamics. A potential limitation of this study is that the site of action of NOE and ceramidase was not defined in our study, and it may have been on the endothelial cells or the smooth muscle cells of the coronary circulation and not directly on the cardiac myocytes. Another potential limitation of the work presented herein arises from a question over the specificity of the ceramidase inhibitor NOE, as it has been reported to influence sarcoplasmic reticulum function and mitochondrial calcium release (32). These effects were observed for NOE concentration far higher (200 μM) than those used in our *in vivo* and *ex vivo* experiments. NOE had no deleterious effects on cardiac myocyte shortening and calcium transients at micromolar concentration (33).

The fact that cardiodepressant effects of endotoxin can be attenuated by the ceramidase inhibitor NOE prompted further study of the effects of sphingosine on contractile ventricular myocytes. We observed that sphingosine impaired myocyte fractional shortening and calcium transient. Sphingosine exposure depresses ventricular myocyte contractile function and disrupts cardiac myocyte calcium handling (i.e., L-type calcium current and calcium release from the sarcoplasmic reticulum) (19–21, 34). Our results confirm that micromolar concentrations of sphingosine induce cardiac myocyte shortening and myocyte calcium transient reductions similar to those detected after cardiac myocyte stimulation with pathophysiologically relevant TNF-α concentrations (19–21, 34, 35).

Mitochondria has been identified as a strategic center that determines sphin-

The ceramidase inhibitor N-oleoylethanolamine prevented endotoxin-induced myocardial depression.

gosine intracellular actions (36). Sphingosine impairs mitochondrial electron transport chain (36, 37) and induces overproduction of reactive oxygen species, which cause mitochondrial membrane potential dissipation and cell death (37). We observed that sphingosine induced a rapid reduction of myocyte TMRM fluorescence intensity, indicating mitochondrial membrane potential dissipation. We propose that mitochondrial membrane potential dissipation induced by sphingosine could in turn impair myocyte contractile function and play a central role in the pathophysiology of septic organ dysfunction.

CONCLUSION

The ceramidase inhibitor NOE prevented endotoxin-induced myocardial depression. Sphingosine, a breakdown metabolite of neutral sphingomyelinase pathway, led to ventricular myocyte contractile and mitochondrial dysfunction. The precise mechanisms of sphingosine-induced myocyte contractile dysfunction warrant further investigations. These observations suggest that sphingolipid metabolites participate in the physiopathology of the septic cardiomyopathy and further support recent clinical evidence (23, 38) pointing to a role of sphingosine metabolites in the complex physiopathology of the sepsis syndrome.

REFERENCES

1. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113:227–242
2. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, et al: The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989; 321:280–287
3. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, et al: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169:823–832
4. Grocott-Mason RM, Shah AM: Cardiac dysfunction in sepsis: New theories and clinical implications. *Intensive Care Med* 1998; 24: 286–295
5. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115:457–469
6. Kumar A, Thota V, Dee L, et al: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183:949–958
7. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999; 27: 1309–1318
8. Edmunds NJ, Woodward B: Effects of tumour necrosis factor-alpha on the coronary circulation of the rat isolated perfused heart: A potential role for thromboxane A2 and sphingosine. *Br J Pharmacol* 1998; 124:493–498
9. Edmunds NJ, Lal H, Woodward B: Effects of tumour necrosis factor-alpha on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: Possible mechanisms for a decline in cardiac function. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 189–196
10. Muller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, et al: Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) is cardiodepressant in pathophysiologically relevant concentrations without inducing inducible nitric oxide-(NO)-synthase (iNOS) or triggering serious cytotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2915–2923
11. Kumar A, Brar R, Wang P, et al: Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276:R265–R276
12. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, et al: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257:387–389
13. Stein B, Frank P, Schmitz W, et al: Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1631–1639
14. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, et al: Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993; 92: 2303–2312
15. Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, et al: Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF- alpha on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:1457–1467
16. Joe EK, Schussheim AE, Longrois D, et al: Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): Mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:303–315
17. Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, et al: Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1338–1346
18. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW: Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79:363–380
19. Oral H, Dorn GW, Mann DL: Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of TNF in the adult mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 4836–4842
20. Webster RJ, Sabbadini RA, Dettbarn CA, et al: Sphingosine effects on the contractile behavior of skinned cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:1273–1290
21. Friedrichs GS, Swillo RE, Jow B, et al: Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy, and decreases survival after myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39:18–28
22. Grandel U, Fink L, Blum A, et al: Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: Evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation* 2000; 102:2758–2764
23. Delogu G, Famularo G, Amati F, et al: Ceramide concentrations in septic patients: A possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27: 2413–2417
24. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, et al: Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 163:218–225
25. Scaduto RC, Grotyohann LW: Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 1998; 1999:469–477
26. Buckman JF, Reynolds IJ: Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons. *J Neurosci* 2001; 21:5054–5065
27. Thielmann M, Dorge H, Martin C, et al: Myocardial dysfunction with coronary microembolization: Signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine. *Circ Res* 2002; 90: 807–813
28. Stamm C, Cowan DB, Friehs I, et al: Rapid endotoxin-induced alterations in myocardial calcium handling: Obligatory role of cardiac TNF-alpha. *Anesthesiology* 2001; 95: 1396–1405
29. Kolesnick R: The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002; 110:3–8
30. Lecour S, Smith RM, Woodward B, et al: Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF-α and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:509–518
31. Granton JT, Goddard CM, Allard MF, et al: Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1977–1983

32. Epps DE, Cardin AD: The interaction of N-oleoylethanolamine with phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1987; 903: 533–541
33. Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, et al: Arachidonic acid mediates dual effect of TNF-alpha on Ca2+ transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1339–C1347
34. McDonough PM, Yasui K, Betto R, et al: Control of cardiac Ca2+ levels. Inhibitory actions of sphingosine on Ca2+ transients and L-type Ca2+ channel conductance. *Circ Res* 1994; 75:981–985
35. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, et al: Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998; 97: 1382–1391
36. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, et al: Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997; 272: 11369–11377
37. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, et al: Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366:79–94
38. Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, et al: Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res* 2003; 44: 754–761

Article n°5

Dans cet article, nous avons évalué la cinétique d'activation des voies régulant l'apoptose conjointement avec l'évolution de la dysfonction cardiaque dans un modèle expérimenbtal de choc septique. En outre, nous avons évalué les effets de la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sur la fonction cardiaque et la survie d'animaux septiques.

Des rats traités par l'endotoxine (10 mg/kg, IV) sont sacrifiés 2, 4, 8, 14 et 24 heures après l'injection de LPS. La fonction cardiaque est alors évaluée par un modèle de cœur isolé-perfusé de type Langendorff. Des cœurs sont également prélevés pour détecter certains marqueurs de l'apoptose (noyaux apoptotiques par la technique TUNEL, caspases actives par Western Blot et immuno-histochimie, exposition des phosphatidylsérines détectée par l'annexine V, évolution des profils d'ARNm codant des protéines impliquées dans la régulation du processus apoptotique par RT-PCR et RPA). Afin de sur-exprimer la protéine Bcl-2, des rats reçoivent une première dose de LPS de 1 mg/kg en intrapéritonéal (IP). Vingt-quatre heures plus tard, une deuxième dose de 10 mg/kg est injectée aux mêmes rats par voie intraveineuse. D'autre part, l'utilisation de souris sur-exprimant Bcl-2 a permis d'évaluer l'importance de cette protéine sur la survie de souris traitées par le LPS (10 mg/kg IP).

Le LPS provoque une dysfonction cardiaque maximale à 4 et 8 heures.
L'endotoxine induit un très faible taux d'apoptose nucléaire, une activation des caspases, une exposition des phosphatidylsérines à la surface des membranes cellulaires. Le profil des ARNm est pro-apoptotique dans les 8 premières heures puis anti-apoptotique au-delà. La sur-expression de Bcl-2 chez les rats préconditionnés permet de réduire partiellement la dysfonction induite par l'endotoxine. Après injection d'endotoxine, le taux de survie des souris transgéniques sur-exprimant Bcl-2 est supérieur à celui des souris sauvages.

L'endotoxine active les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. La modulation de l'apoptose via la sur-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 permet d'améliorer la fonction cardiaque et la survie des animaux septiques.

Ces résultats confirment les résultats précédents sur l'implication forte de la mitochondrie et de ses voies d'apoptose sur la fonction d'organes.

Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats*

Steve Lancel; Patrice Petillot; Raphael Favory; Nicolas Stebach; Christophe Lahorte; Pierre Marie Danze; Benoît Vallet; Philippe Marchetti; Remi Neviere

Objectives: **To document the time course of apoptosis pathway activation in sepsis and to determine whether Bcl-2 overexpression would improve endotoxin-induced myocardial dysfunction and mortality rate.**

Design: **Randomized, controlled trial.**

Setting: **Experimental laboratory.**

Subjects: **Male Sprague Dawley rats, wild-type C57BL/6 female mice, C57BL/6 female mice overexpressing Bcl-2.**

Interventions: **Hearts were isolated from rats treated with endotoxin (10 mg/kg, intravenously) to perform heart function, immunohistochemistry (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick 3'-end labeling, caspase 3), RNase protection assay, reverse transcriptase polymerase chain reaction, Western blotting (caspase 3), and radiolabeled annexin V studies. Twenty-four hours before endotoxin challenge (10 mg/kg, intravenously), rats were pretreated with saline or endotoxin (0.5 mg/kg, intraperitoneally), with or without parthenolide (1 mg/kg, intraperitoneally). Isolated hearts were used to test myocardial function. Mortality induced by endotoxin (10 mg/kg, intraperitoneally) was tested on wild-type or mice overexpressing Bcl-2.**

Measurements and Main Results: **Endotoxin-induced heart dysfunction was maximal at 4 and 8 hrs postinjection, started to improve, and was fully restored at 24 hrs after endotoxin treatment. Endotoxin also induced phosphatidylserine outer leaflet membrane exposure, caspase 3 activation, nuclear apoptosis, and changes in apoptosis gene expression. Bcl-2 overexpression induced by endotoxin pretreatment prevented endotoxin-induced myocardial dysfunction. Mice overexpressing Bcl-2 had dramatic improvement in survival rate compared with wild-type mice.**

Conclusions: **These observations suggest that both death receptor and caspase-mediated apoptosis processes are activated in this sepsis model. Bcl-2 overexpression before endotoxin challenge prevents myocardial dysfunction in rats and improves survival rate in mice. (Crit Care Med 2005; 33:492–496)**

Key Words: cardiomyopathy; apoptosis; caspase; endotoxin; Bcl-2

Apoptosis has been associated with both human disease states and animal models such as myocardial infarction, congestive heart failure, ischemia reperfusion, and sepsis (1–3). Apoptosis is initiated by activation of death receptors and mitochondria, which involve death ligands binding to specific membrane-bound death receptors and cytochrome *c* release from mitochondria, respectively (4, 5). Death receptors and mitochondria pathways act by activating downstream effector caspases, that is, caspase 3, which ultimately executes the biochemical and structural changes seen in terminal nuclear apoptosis and cell death. Although biochemical apoptotic pathways are activated in the heart, an extremely low number of cardiomyocytes ultimately evolve to cell death (6–8). For example, the absolute number of cardiomyocyte cell deaths observed in models of sepsis may not be sufficient to explain the dramatic progression of heart dysfunction (8, 9).

The reason why endotoxin stimulation does not lead to terminal nuclear apoptosis in heart cells is not known. Cardiomyocytes, the contractile cells of the heart, are terminally differentiated cells, and many pro- and antiapoptotic factors may alter their survival in the injured myocardium (3, 5, 7). Bcl-2 family genes are recognized as regulators of the apoptotic mechanisms with opposing effects. Bcl-2 and Bcl-xL are the principal Bcl-2 family proteins that protect cells from apoptosis, whereas Bax and Bcl-xs promote cell death (4). At the level of protein expression, Bax protein induces formation of a large channel in outer mitochondrial membrane and voltage-dependent anion channel opening, which leads to proapoptotic cytochrome *c* release into the cytosol (3, 4). Heterodimerization of Bcl-2 and Bax induced cytoprotection at the mitochondria by preventing cytochrome *c* release (4).

In sepsis, both Bcl-2 and Bax protein levels decline and then rebound so that Bax-to-Bcl-2 ratio favors apoptosis in the first hours following endotoxin infusion (7). Endotoxin also has an effect on regulating transcription of bax and bcl-2 genes, but the pattern of messenger RNA (mRNA) bax and mRNA bcl-2 is neither clearly proapoptotic nor prosurvival (7). In a model of sepsis induced by endotoxin, we sought to document heart apoptosis using multiple biological approaches, including terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick 3'-end labeling (TUNEL) assay, membrane externalization of phosphatidylserine, effector caspase activation, and Bcl-2 family gene expression. As Bcl-2 may provide cytoprotection in different models of sepsis (10–12), we tested

***See also p. 670.**

From Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Lille 2 (LS, RF, RN), Département d'Anesthésie–Réanimation (PP, BV), and INSERM U459 (NS, PMD, PM), Faculté de Médecine, Lille, France; and Département de Radiopharmacie (CL), Faculté de Sciences Pharmaceutiques, Université de Gand, Harelbekestraat, Belgique.

Supported, in part, by grants from MENRT and INSERM: "Biologie et pathologie des régulations cellulaires" (U459) and from EA 2689, Université Lille 2.

Copyright © 2005 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000156240.31913.4A

whether increases in Bcl-2 protein expression would improve endotoxin-induced myocardial dysfunction and mortality rate.

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation. Adult male Sprague-Dawley rats (250–300 g, Iffa-Credo, France) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, intraperitoneally). Either 10 mg/kg endotoxin from *Escherichia coli* serotype 055:B5 in 500 μL of saline or 500 μL of saline was administered intravenously via the dorsal penine vein. To induce endotoxin tolerance, 24 hrs before treatment, rats received intraperitoneal injection of 0.50 mg/kg body weight. As a control, other animals received injections of an equal volume of saline. Rats were killed for heart function and biochemistry evaluation at indicated times.

Six-week-old C57BL/6 female mice (20 g) were purchased from Charles River (Lyon, France). Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 (CDTA Institut de Transgénose CNRS, Orléans, France) were on a C57BL/6 background, and specific expression was controlled by cell specific promoters. Either 10 mg/kg endotoxin from *E. coli* serotype 055:B5 in 200 μL of saline or 200 μL of saline was administered intraperitoneally. Mice were followed up to 96 hrs after treatment and killed if they exceeded the predetermined follow-up period.

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, and the protocol study was approved by Lille's Animal and Use Committee.

Heart Function. Hearts were isolated and *ex vivo* myocardial contractile function was studied using a modified Langendorff preparation as previously described (8, 9). Left ventricular developed pressure, its first derivative (maximal change in pressure over time), and coronary perfusion pressure were recorded (Biopac Systems, Goleta, CA).

Immunohistochemistry of Heart Sections and Western Blotting Analysis. Hearts were harvested after endotoxin treatment and prepared for either histochemistry or Western blotting techniques. A first set of heart sections 4 μm was stained with TUNEL (Roche Diagnostics). A second set of slides was stained with a monoclonal anti-caspase 3 antibody (Abcam, UK). The fractional area of caspase 3 positive staining was measured for 20 fields at ×400 magnification on digitalized captured images using a computer assisted image analyzer (Mocha software, Jandel, San Rafael, CA). Western blotting of caspase 3 was performed on total heart lysate using a polyclonal rabbit anti-caspase 3 antibody (BD Pharmingen, CA), which recognizes both 32-kDa unprocessed procaspase 3 and 17-kDa subunit of the active caspase 3. Bcl-2 was detected on total heart lysate using polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Radioligand Preparation and Uptake. Radiolabeling of recombinant human annexin V (Becton Dickinson, Belgium) and human serum albumin (HSA) was performed according to the Iodo-Gen method as previously described (13). Rats received a dose of 11.1–18.5 MBq of ^{123}I-annexin V (10.5 ± 0.1 μg of protein) or 7.4 to 11.1 MBq of an equimolar dose of ^{123}I-HSA (±18 μg of protein). Anesthetized rats were then killed at 4, 8, 14, and 24 hrs posttreatment. Hearts were collected, and radioactivity uptake was determined as percentage of injected dose per gram (% ID/g) heart tissue with a NaI γ-counter (LKB; Packard, Ghent, Belgium).

RNase Protection Assay and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. The RNase protection assays were carried out using the Multi-Probe RNase Protection Assay System with rAPO-1 multiprobe template set (PharMingen, San Diego, CA) specific for rat-associated mRNA molecules. Apoptotic associated mRNA molecules probed for were Fas, bcl-2, bcl-xL, bax, and caspases 1, 2, and 3. L32, a housekeeping gene, was included as control. At described times after endotoxin exposure, heart RNA was collected using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY). The RNA was stored in RNase-free water at −70°C until use. Riboprobes were synthesized using an *in vitro* transcription kit (PharMingen).

To examine further mRNA expression, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on total RNA isolated from hearts. Five micrograms of RNA was reverse transcribed using a SuperScript Preamplification System (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The RT product was diluted and PCR was performed with primers specific for rat Fas, bcl-2, bcl-xL, bax, and caspases and with primers and competimers for the 18S ribosomal RNA (Ambion, Austin, TX).

Experimental Design. Independent groups of rats were used for heart preparation, immunohistochemistry and Western blotting, radioligand studies, RNase protection assays, and preconditioning experiments. Hemodynamic studies in the *ex vivo* heart preparation were performed in controls and rats killed at 2, 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 8 in each group). Immunohistochemistry (TUNEL, active caspase 3) and Western blot (caspase 3) studies were performed in controls and rats killed at 8 and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 8 in each group). Radiolabeled annexin V studies were performed in controls and rats killed at 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 8 in each group). HSA studies were performed in controls and rats killed at 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 4 in each group). RNase protection assays were performed in controls and rats killed at 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 4 in each group). Bcl-2 overexpression was achieved by the use of low-dose endotoxin (0.5 mg/kg) preconditioning (n = 4 rats). Because endotoxin preconditioning involves nuclear factor (NF)-κB translocation, we evaluated the effects of parthenolide (1 mg/kg, intraperitoneally), an NF-κB inhibitor, given with low-dose endotoxin pretreatment. Hemodynamic studies in the *ex vivo* heart preparation were performed in saline and endotoxin preconditioned rats (n = 8 in each group).

Statistics. Data represent mean ± SEM and were analyzed by analysis of variance procedures. When a significant difference was found, we identified specific differences between groups using a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of Bonferroni correction, significance was achieved with $p < .05$ for comparisons with controls. Survival was evaluated using Fisher's exact test.

RESULTS

Endotoxin-Induced Clinical Sepsis and Myocardial Dysfunction in the Isolated Heart Preparation. After endotoxin injection (10 mg/kg body weight), rats presented tachycardia, diarrhea, polypnea, and piloerection. All rats survived in saline and endotoxin-treated groups. Left ventricle (LV) function was determined in independent groups of rats, that is, in controls and 2, 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin injection. *Ex vivo* LV developed pressure, its first derivative (i.e., maximal change in pressure over time), and coronary perfusion pressure were recorded after a period of equilibration of 30 mins (Fig. 1). Endotoxin was found to maximally depress LV contractile function at 4 and 8 hrs posttreatment. LV contractile function then started to improve and was fully restored at 24 hrs after endotoxin treatment.

Endotoxin-Induced Activation of Apoptotic Pathways and Minimal Cardiomyocyte Cell Apoptotic Death. To determine the degree of end-stage apoptosis, we quantified TUNEL staining within control and septic hearts (n = 8 rats in each group). Whereas no positive staining was detected in controls, only a few positive TUNEL stainings (i.e., <1/850 nuclei) were observed in endotoxin-treated (10 mg/kg) rat hearts at 8 hrs (Fig. 2*A*) and 24 hrs (data not shown). This low level of end-stage nuclear apoptotic cells was associated with increases in membrane exposure of phosphatidylserine as assessed by ^{123}I-annexin V binding in septic heart compared with controls (n = 8 in each group). As shown in Figure 2*B*, LV ^{123}I-annexin V uptake was significantly increased in rat hearts treated with 10 mg/kg endotoxin at 4, 8, 14, and 24 hrs. Similar nonspecific protein ^{123}I-HSA uptake was observed in the hearts of control and endotoxin-treated rats (data not

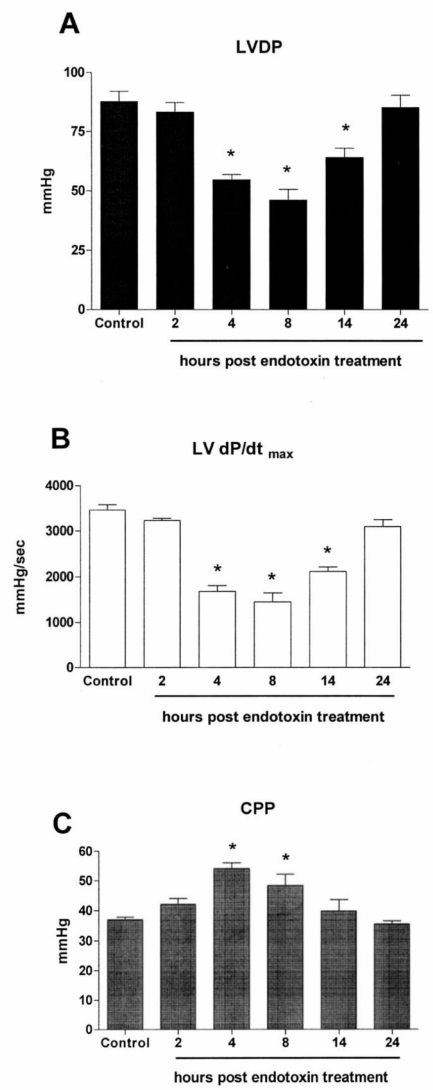


Figure 1. Time course of myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *A*, left ventricular developed pressure (*LVDP*); *B*, maximum first derivative, maximal change in pressure over time (dP/dt_{max}); and *C*, coronary perfusion pressure (*CPP*) were recorded in controls and at 2, 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment (n = 8 in each group). Left ventricular end-diastolic pressure was set at 5 mm Hg. Results are mean ± SEM. $^*p < .05$ compared with controls.

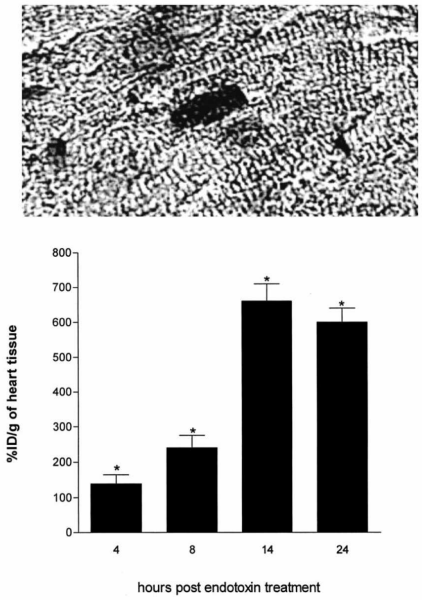


Figure 2. *A*, representative microphotograph of endotoxin-treated myocardial section stained with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick 3'-end labeling assay. Eight hours after treatment, 4-μm paraffin-embedded tissue sections were prepared from left ventricular free wall obtained from controls (n = 8) or endotoxin-treated rats (n = 8). Original magnification ×400. See Results for quantitative evaluation. *B*, time course apparition of heart left ventricular ^{123}I-annexin V uptake and endotoxin-treated rat hearts. Eight rats, treated or not with endotoxin, were included for each time point measurement. Rats were killed at 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin or saline treatment. In each rat, ^{123}I-annexin V (radioactive dose, 11.1–18.5 MBq; mass dose, 10 μg of protein) was administered 4 hrs before death. Heart tissue radioactivity was determined at 4, 8, 14, and 24 hrs after endotoxin treatment. ^{123}I-annexin V heart uptake, expressed as percent of ^{123}I-annexin V ID/g of heart tissue of matched time saline-treated rat, increased over time in endotoxin-treated rat hearts (n = 8 in each group). Results are mean ± SEM. $^*p < .05$ vs. controls.

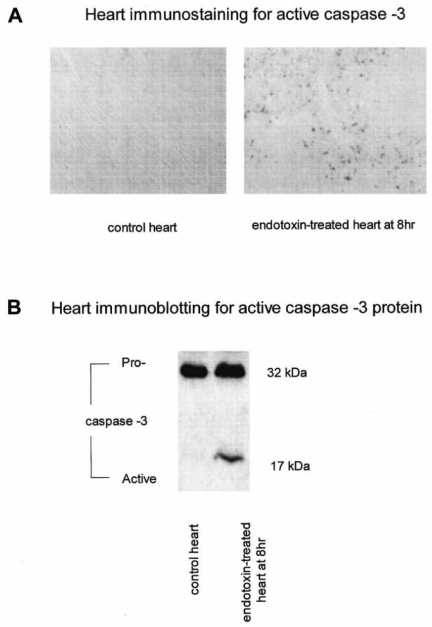


Figure 3. Representative active caspase 3 staining (*A*) in heart sections and detection of active caspase 3 (17-kDa subunit) by Western blotting (*B*) in controls and endotoxin-treated rat hearts harvested 8 hrs after treatment. Individual microphotographs are representative of studies performed in eight rats in each group.

shown). Evidence for activation of apoptotic processes was further tested using detection of activated/cleaved caspase 3 in the heart. Positive staining for active caspase 3 was observed in heart sections 8 hrs (Fig. 3*A*) and 24 hrs (data not shown) after endotoxin treatment (n = 8 in control and endotoxin-treated groups). Fractional area of caspase 3 positive staining increased in endotoxin treated rats (positive area, 12 ± 8% in endotoxin vs. 2 ± 5% in controls). The 17-kDa subunit of the active caspase 3 was detected by Western blot at 8 hrs (Fig. 3*B*) and 24 hrs (data not shown).

Endotoxin-Induced Changes in Pro- and Antiapoptotic Gene Expression. We examined expression level of genes involved in apoptosis to define the molecular changes that are associated with this model of endotoxemia (n = 4 in control and endotoxin-treated groups). First, we examined the mRNA expression level of various apoptosis-related genes using an RNase protection assay. Semiquantitative analysis (RT-PCR) of these genes relative to the internal control gene showed that endotoxin treatment was associated with proapoptotic and prosurvival gene changes in death receptor, mitochondria, and caspase-mediated apoptotic pathways (Fig. 4). Death receptor, Fas, caspase 1, caspase 3, bcl-xL, and bax mRNA expression were increased in septic hearts. Whereas Fas rapidly returned to baseline levels, endotoxin treatment caused maximal increases in caspase 3 and bax mRNA expression at 8 hrs, which then decreased over time. Sustained increases in bcl-xL mRNA expression and bcl-xL/bax ratio were observed in septic hearts. Whereas Bcl-2 mRNA did not change significantly, bcl-2/bax mRNA ratio rapidly decreased over time and then increased in septic hearts. Caspase 2 mRNA expression was not altered over time after endotoxin treatment.

Overexpression of Bcl-2 in Rat Heart Prevented Endotoxin-Induced Myocardial Dysfunction and Improved Survival in Mice. We observed that rat preconditioning with low-dose endotoxin (0.5 mg/kg, intraperitoneally) induced increases in heart Bcl-2 expression at 24 hrs in the heart (Fig. 5). Endotoxin preconditioning markedly improved *ex vivo* myocardial dysfunction evaluated as LV developed pressure and its first derivative (i.e., maximal change in pressure over time, Table 1). Parthenolide altered increases in nei-

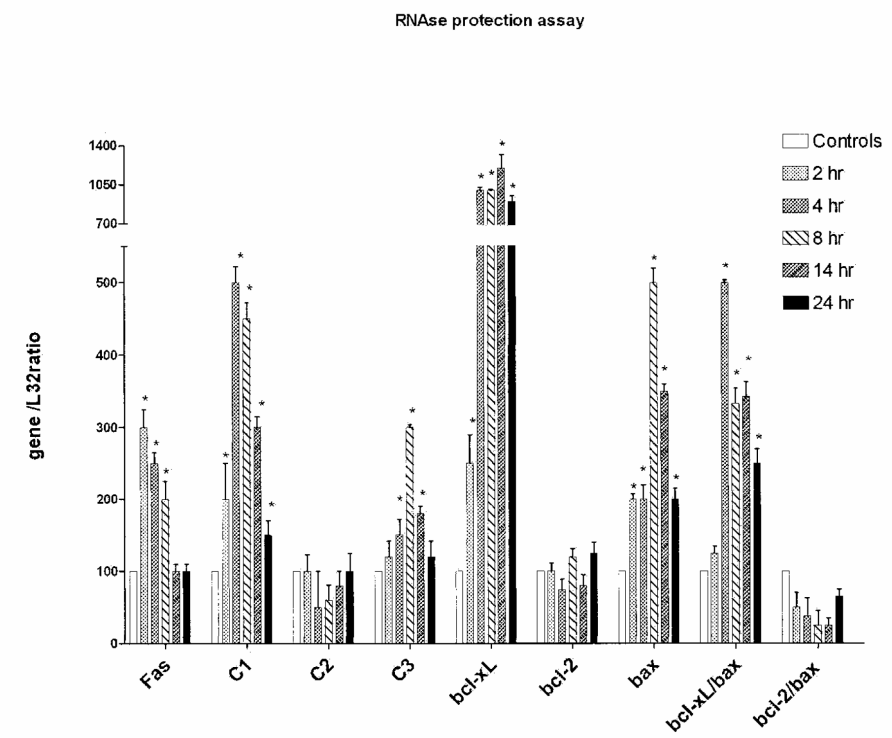


Figure 4. RNase protection assay of several apoptosis-related genes in controls and endotoxin-treated rat hearts. L32 was used as internal controls. Semiquantitative analysis of various apoptosis-related genes from RNase protection assay is presented as gene/L32 ratio (n = 4 in each group). *C1*, caspase 1; *C2*, caspase 2; *C3*, caspase 3. Results are representative of the mean ± SEM. $*p < .05$ compared with controls.

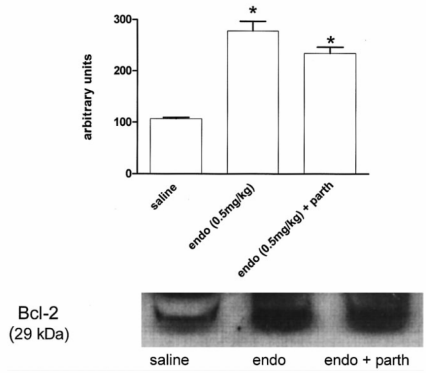


Figure 5. Heart Bcl-2 protein expression (*top*) in controls and low-dose endotoxin (*endo*)-treated rats harvested 24 hrs after treatment (n = 8 in each group). Individual microphotographs of 29-kDa unit Bcl-2 are displayed in each group (*bottom*). Results (*top*) are representative of the mean ± SEM.

ther heart Bcl-2 expression (Fig. 5) nor myocardial function (Table 1), suggesting that the benefit of endotoxin tolerance was, at least part, independent of the NF-κB pathway. To reinforce the contention that Bcl-2 expression has beneficial effects in models of experimental sepsis induced by endotoxin, we evaluated mortality rate in endotoxin-treated mice overexpressing Bcl-2 or not. We observed that transgenic mice overexpressing human Bcl-2 had a dramatic improvement in survival rate compared with C57BL/6 mice (n = 12 in each group, Fig. 6).

DISCUSSION

In experimental sepsis, numerous studies have evaluated the role of apoptotic pathway program activation (7–12, 14–16). In cardiomyocytes, terminally differentiated cells, the extremely low level of cell death is insufficient to explain the dramatic progression of heart dysfunction (7–9). We sought to evaluate the role of pro- and antiapoptotic regulatory factors that may alter ultimate cardiomyocyte fate in response to endotoxin. The new information of our study is two-fold. First, early after endotoxin administration, both proapoptotic and antiapoptotic pathways are triggered in the heart. Second, overexpression of Bcl-2 prevents, at least part, myocardial dysfunction in endotoxin-treated rats and improves survival in endotoxin-treated transgenic mice, confirming that Bcl-2 provides protection in sepsis.

Growing evidence suggest that during sepsis, apoptotic pathways are stimulated within the myocardium. Although both death receptors and mitochondria pathways may be triggered by endotoxin, only a few myocardial cells evolve to end-stage nuclear apoptosis (7, 8). Consistently, an extremely low level of TUNEL-positive cells was observed in endotoxin-treated rat hearts. Despite these low levels of end-stage apoptosis, initiation and execution phases of apoptosis were further demonstrated by detection of membrane exposure of phosphatidylserine and caspase 3 activation/cleavage. Phosphatidylserine externalization is regarded as one of the earliest hallmarks of cells undergoing programmed cell death (17–19). Our results confirm that phosphatidylserine externalization assessed by ^{123}I-annexin V uptake increased over time in the septic heart. This information is important, as annexin V staining has been previously shown in the heart to identify a subpopulation of myocytes that exhibit cell shrinkage, caspase 3 activation, and mitochondrial calcium overload, which all may contribute to myocardial contractile dysfunction (20, 21). Indeed, increases in active caspase 3 were detected in hearts of endotoxin-treated rats. Recent studies indicate that activated caspases may directly impair myocardial function via changes in calcium handling and cleavage of sarcomeric myofilaments, independent of their modulation of nuclear apoptosis (22–24). We (8, 9) and other groups (25) have demonstrated that *in vivo* caspase activity blockade by broad spectrum and effector caspase (i.e., caspase 3) inhibitors reduced caspase 3 activity and myocardial dysfunction after endotoxin exposure.

Endotoxin is capable of regulating apoptosis gene transcription. Within the first hours after endotoxin administration, changes in Fas, caspase 1, caspase 3, bcl-2, and bax mRNA pattern were clearly proapoptotic. Then, the proapoptotic to antiapoptotic pathway balance switched in favor of cell survival. As these changes were timely related to myocardial dysfunction, we tested whether increases in Bcl-2 protein before endotoxin administration would improve myocardial dysfunction. Endotoxin tolerance (26) induced increases in Bcl-2 protein in rat heart tissue, which prevented endotoxin-induced myocardial dysfunction. Beneficial effects of endotoxin preconditioning have been related to NF-κB translocation. In our preconditioning protocol, use of par-

Table 1. Effects of endotoxin preconditioning on endotoxin-induced myocardial dysfunction evaluated by the *ex vivo* heart preparation at 4 hrs

Preconditioning (24 Hrs Prior)	Treatment	LVDP	dP/dt max	CPP
Saline	Saline	100 ± 5^a	3100 ± 250^a	45 ± 5
Endo, 0.5 mg/kg	Saline	102 ± 6^a	3250 ± 190^a	44 ± 6
Saline	Endo (10 mg/kg)	56 ± 5^b	1750 ± 200^b	50 ± 2^b
Endo, 0.5 mg/kg	Endo (10 mg/kg)	95 ± 9^a	2900 ± 350^a	48 ± 6
Endo, 0.5 mg/kg, + parth, 1 mg/kg	Endo (10 mg/kg)	$78 \pm 6^{a,b}$	$2550 \pm 120^{a,b}$	45 ± 6

LVDP, peak left ventricular developed pressure, mm Hg; dP/dt max, maximal first derivative of left ventricular developed pressure, mm Hg/sec; CPP, coronary perfusion pressure, mm Hg; Endo, endotoxin; parth, parthenolide. Preconditioning treatments were administered intraperitoneally 24 hrs prior to intravenous treatments. Values are mean ± SEM (n = 8 in each group).

$^a p < .05$ compared with saline/saline-treated group; $^b p < .05$ compared with saline/endotoxin (10 mg/kg)-treated group.

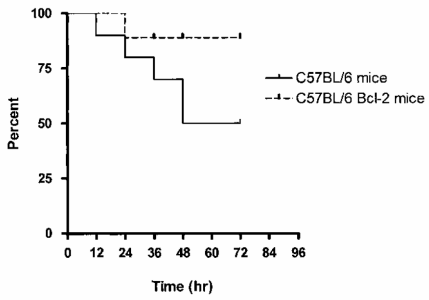


Figure 6. Overexpression of Bcl-2 improved survival during endotoxemia. Wild-type C57BL/6 and Bcl-2 transgenic C57BL/6 mice were treated with endotoxin (10 mg/kg, n = 12 in each group). Mice overexpressing Bcl-2 had improved survival compared with C57BL/6 control mice. $^* p < .05$ compared with controls.

thenolide, an NF-κB inhibitor, altered neither increases in heart Bcl-2 expression nor improvement in myocardial function. Hence, beneficial effects of endotoxin tolerance were, at least in part, independent of NF-κB pathway activation. The contention that Bcl-2 expression has beneficial effects in experimental sepsis (10–12) was reinforced by the finding that transgenic mice overexpressing human Bcl-2 have dramatic improvement in survival rate compared with wild-type mice.

CONCLUSIONS

Our findings suggest that in a rat model of endotoxemia not complicated with circulatory failure, both death receptor and caspase-mediated apoptosis processes are activated. Endotoxin altered regulating transcription bcl-2 family gene so that changes in mRNA pattern were initially proapoptotic and then in favor of cell survival. Bcl-2 overexpression before endotoxin challenge prevents, at least in part, myocardial dysfunction and improves survival in endotoxin-treated transgenic mice.

We thank F. Charbonnel of INSERM U459, Lille, France; E. Bonanno of the Department of Biopathology and Diagnostic Imaging, University of Tor Vergata, Rome, Italy; and A. Signore of the Department of Nuclear Medicine, University of La Sapienza, Rome, Italy, for technical assistance in the completion of this study.

REFERENCES

1. Davies MJ: Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart* 1997; 77:498–501
2. Schwartz SM, Duffy JY, Pearl JM, et al: Cellular and molecular aspects of myocardial dysfunction. *Crit Care Med* 2001; 29:S214–S219
3. McGowan BS, Ciccimaro EF, Chan TO, et al: The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3:191–206
4. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309–1312
5. Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al: Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:8144–8149
6. Kumar A, Haery C, Parrillo JE: Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 2000; 16:251–287
7. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, et al: Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2053–H2061
8. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, et al: Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:218–225
9. Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, et al: Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H1608–H1614
10. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14541–14546
11. Iwata A, Stevenson VM, Minard A, et al: Overexpression of Bcl-2 provides protection in septic mice by a trans effect. *J Immunol* 2003; 171:3136–3141
12. Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE, et al: Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med* 2002; 30:195–201
13. Lahorte CM, van de Wiele C, Bacher K, et al: Biodistribution and dosimetry study of 123I-rh-annexin V in mice and humans. *Nucl Med Commun* 2003; 24:871–880
14. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230–1251
15. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138–150
16. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al: Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000; 1:496–501
17. Rucker-Martin C, Henaff M, Hatem SN, et al: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis of adult rat ventricular myocytes in vitro. *Basic Res Cardiol* 1999; 94:171–179
18. Maulik N, Kagan VE, Tyurin VA, et al: Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis. *Am J Physiol* 1998; 274: H242–H248
19. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, et al: In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6349–6354
20. Dumont EA, Hofstra L, van Heerde WL, et al: Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: Measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation* 2000; 102:1564–1568
21. Narayan P, Mentzer RM Jr, Lasley RD: Annexin V staining during reperfusion detects cardiomyocytes with unique properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H1931–H1937
22. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, et al: Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther* 2001; 12:2051–2063
23. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al: Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:6252–6256
24. Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, et al: Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9977–9982
25. Methot N, Huang J, Coulombe N, et al: Differential efficacy of caspase inhibitors on apoptosis markers during sepsis in rats and implication for fractional inhibition requirements for therapeutics. *J Exp Med* 2004; 199:199–207
26. West MA, Heagy W: Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002; 30:S64–S73

Article n°6

Le but de cet article était de montrer que la dysfonction mitochondriale pouvait jouer un rôle causal dans les défaillances d'organes (cœur/poumon) et la mortalité dans un modèle de CLP chez la souris. Ceci suggère que la dysfonction mitochondriale est possiblement la cause initiale des défaillances d'organe et donc être plus qu'un épiphénomène ou la conséquence d'altérations microcirculatoires avec une hypoxie dans le cadre du sepsis.

En effet, la cyclosporine, un analogue non immunosupresseur de la cyclosporine (le NIM811) et la sur-expression de BcL-2 par les souris transgéniques préviennent la défaillance cardiaque (contractilité *ex vivo*) et pulmonaire (ratio poumon sec/mouillé, protéines de LBA, activité myéloperoxydase).

L'étude de la respiration mitochondriale myocardique par repirométrie de haute résolution montre pour les souris traitées par NIM811 et qui sur-expriment Bcl-2 une augmentation du stade 3, du stade 4, du RCR (stade 4 / stade 3) et du flux maximal d'oxygène par rapport aux souris non traitées. La cyclosporine réduit le stade 4, augmente partiellement le stade 3 sans modification du flux maximal d'oxygène.

De la même façon, le taux de calcium nécessaire pour observer *in vitro* une transition de perméabilité augmente et se rapproche de mitochondries de souris contrôles avec cyclosporine, NIM811 et sur-expression de Bcl-2 par rapport à des mitochondries isolées de souris non traitées.

Journal of the American College of Cardiology
Vol. 48, No. 2, 2006
ISSN 0735-1097/06/$32.00
doi:10.1016/j.jacc.2006.02.069
© 2006 by the American College of Cardiology Foundation
Published by Elsevier Inc.

Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Prevents Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction and Mortality

Jérome Larche, MD,*† Steve Lancel, PHD,*† Sidi Mohamed Hassoun,*† Raphael Favory, MD,*† Brigitte Decoster, PHD,*† Philippe Marchetti, MD, PHD,‡ Claude Chopin, MD,* Remi Neviere, MD, PHD*†

Lille, France

OBJECTIVES The purpose of this study was to test whether mitochondrial dysfunction is causative of sepsis sequelae, a mouse model of peritonitis sepsis induced by cecal ligation and perforation. Inhibition of mitochondrial permeability transition was achieved by means of pharmacological drugs and overexpression of the antiapoptotic protein B-cell leukemia (Bcl)-2.

BACKGROUND Sepsis is the leading cause of death in critically ill patients and the predominant cause of multiple organ failure. Although precise mechanisms by which sepsis leads to multiple organ dysfunction are unknown, growing evidence suggests that perturbations of key mitochondrial functions, including adenosine triphosphate production, Ca^{2+} homeostasis, oxygen-derived free radical production, and permeability transition, might be involved in sepsis pathophysiology.

METHODS Heart and lung functions were evaluated respectively by means of isolated heart preparation, bronchoalveolar lavage fluid protein concentration, lung wet/dry weight ratio, lung homogenate myeloperoxidase activity, and histopathologic grading. Respiratory fluxes, calcium uptake, and membrane potential were evaluated in isolated heart mitochondria.

RESULTS Peritonitis sepsis induced multiple organ dysfunction, mitochondrial abnormalities, and increased mortality rate, which were reduced by pharmacological inhibition of mitochondrial transition by cyclosporine derivatives and mitochondrial Bcl-2 overexpression.

CONCLUSIONS Our study provides strong evidence that mitochondrial permeability transition plays a critical role in septic organ dysfunction. These studies demonstrate that mitochondrial dysfunction in sepsis is causative rather than epiphenomenal and relevant in terms of vital organ function and outcome. Regarding the critical role of heart failure in the pathophysiology of septic shock, our study also indicates a potentially new therapeutic approach for treatment of sepsis syndrome. (J Am Coll Cardiol 2006;48:377–85) © 2006 by the American College of Cardiology Foundation

Sepsis is the systemic inflammatory response associated with gram-negative, gram-positive, and fungal infections. An estimated 750,000 cases of severe sepsis occur each year in the U.S., causing 210,000 deaths annually (1). Once severe sepsis is recognized, development of cardiovascular failure is associated with high mortality rates that have been estimated to be 30% to 60% (2). The majority of septic patients die of refractory hypotension and cardiovascular collapse. Proposed mechanisms of sepsis-induced cardiovascular dysfunction include microvascular dysfunction, presence of activated leukocytes, and effects of various circulating and/or locally produced proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin-1-beta (1,2). In addition, recent evidence suggests that severity of myocardial dysfunction and eventual mortality could be related to mitochondrial dysfunction (3–7). Indeed, both human sepsis and experimental models of sepsis manifest evidence of mitochondrial ultrastructural damage and bioenergetic abnormalities that correlate with septic response severity (4–7). Unresolved issues include, however, the need to establish that mitochondrial dysfunction is causative rather than epiphenomenal and to determine how relevant these abnormalities are in terms of vital organ function and outcome.

Manifestations of mitochondrial dysfunction are typically reflected in ultrastructural damage and swelling, often associated with membrane potential collapse and permeability transition (3,8). Mitochondrial permeability transition has been associated with matrix swelling, uncoupling of the respiratory chain, efflux of Ca^{2+}, membrane potential collapse, and release of small proteins such as cytochrome c (8,9). Mitochondrial permeability transition is thought to be mediated by the opening of specific high-conductance channels, whose molecular structure remains imperfectly known (10). Key structural components of these multiprotein complex channels are adenine nucleotide translocator in the inner mitochondrial membrane, cyclophilin D in the matrix, and the voltage-dependent anion channel in the outer mitochondrial membrane (11–13). Cyclosporine A (CsA), a potent immunosuppressive compound, inhibits mitochondrial permeability transition by binding to matrix cyclophilin D (14,15). Other inhibitors of permeability transition pore opening include non-immunosuppressive cyclosporine analogs, bongkrekic acid and anti-apoptotic

From the *EA 2689, Université de Lille 2, †Département de Physiologie, and the ‡INSERM U459, Faculté de Médecine 1, Lille, France. This work was supported by Bourse 2003 de la Fondation de l'Avenir and Bourse 2003 de la Fondation de France pour la Recherche Médicale. Dr. Lancel is supported by grants from the Ministère de l'éducation nationale, de la recherche et de la technologie MENRT 3857-2002. Drs. Larche and Lancel contributed equally to this work.

Manuscript received November 9, 2005; revised manuscript received February 17, 2006, accepted February 28, 2006.

JACC Vol. 48, No. 2, 2006
July 18, 2006:377–85

Abbreviations and Acronyms

BALF	= bronchoalveolar lavage fluid
Bcl	= B-cell leukemia
CLP	= cecal ligation and puncture
CsA	= cyclosporine A
$\Delta\psi m$	= mitochondrial transmembrane potential
MPO	= myeloperoxidase
NIM811	= N-methyl-4-isoleucine cyclosporine
RCR	= respiratory control ratio
TNF	= tumor necrosis factor
TPP^+	= tetraphenylphosphonium

B-cell leukemia (Bcl) proteins, such as Bcl-2 and Bcl-xL (10). The relevance of mitochondrial permeability transition inhibition by cyclosporine analogs for their cytoprotective effects is well documented in many cellular models (11–13). Mechanisms of action in vivo are more difficult to define, and accordingly the evidence is as yet less compelling in animal models of ischemia/reperfusion injury (14,15), trauma (16), and sepsis (6).

Hence, the specific objective of our study was to test whether inhibition of permeability transition achieved by means of immunosuppressive and non-immunosuppressive analogs of CsA and mitochondrial Bcl-2 protein overexpression would improve vital organ dysfunction and outcome in a mouse model of peritonitis chronic sepsis.

METHODS

Animals used. All experiments were conducted in accordance with the National and European Institutes of Health guidelines for the use of laboratory animals and were approved by the Lille University. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). In brief, 6- to 10-week-old female C57Bl/6 mice (Charles Rivers Laboratories, Lyon, France) and Bcl-2 transgenic mice were housed for 6 days before manipulation. Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 (Bcl-2-22, CDTA Institut de Transgénose CNRS, Orléans, France) were generated on a C57Bl/6 background. All animals in the study were screened for the presence of Bcl-2 transgene by using polymerase chain reaction with tail deoxyribonucleic acid.

Sepsis model. Cecal ligation and puncture (CLP) was used to induce intra-abdominal peritonitis and sepsis as previously described (17). Under anesthesia (intraperitoneal [IP] ketamine 2.5 mg/kg and xylazine 0.25 mg/kg), the cecum was ligated with 4-0 silk suture immediately distal to the ileocecal valve, punctured once with a 21-gauge needle and gently squeezed to extrude some stool. The cecum was then replaced into the abdomen, which was closed in two layers, followed by a 1.0-ml subcutaneous injection of 0.9% saline. Sham-operated animals were treated identically, except the cecum was neither ligated nor punctured. Animals were maintained on 12-h light/dark cycles with free access to water.

Animal treatments. Mice were treated immediately after surgery procedures. Sham and CLP C57Bl/6 wild-type mice were randomized to receive 1.0-ml subcutaneous injection of either: 1) vehicle (1% ethanol in saline); 2) 2, 10, and 100 mg/kg CsA (a potent immunosuppressive drug that also inhibits mitochondrial permeability transition); 3) 2 mg/kg tacrolimus FK506 (a potent immunosuppressive drug that has no effects on mitochondrial permeability transition); or 4) 2, 10, and 100 mg/kg N-methyl-4-isoleucine CsA (Novartis, Basel, Switzerland) NIM811 (a non-immunosuppressive drug that inhibits mitochondrial permeability transition) in vehicle. Sham and CLP Bcl-2 transgenic mice received 1.0-ml injection of vehicle.

Survival studies. Survival studies after CLP were repeated twice. An investigator blinded to the identity of the mice performed a 96-h follow-up both in wild-type and in Bcl-2 transgenic mice in two separate experiments with 12 mice per group.

Myocardial function. Isolated heart preparation was performed with a method modified for the mouse heart (18). Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (65 mg/kg IP), and heparin (100 U) was injected intravenously. The thorax was opened. The heart was quickly excised, placed in ice-cold saline, and immediately mounted, via the ascending aorta, onto a perfusion apparatus. The heart was perfused with a nonrecirculating perfusate at a constant flow (1.5 ± 0.1 ml/min). Coronary flow and coronary perfusion pressure were measured with a transit-time ultrasound flowmeter (Transonic, Ithaca, New York) and pressure transducers (Baxter Healthcare Corp., Irvine, California). A metal hook was inserted into the apex of the heart to control and record tension and heart rate. Tension was measured with a UF1 dynamometer transducer (UF1 BS4, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Transducers were calibrated and connected to a ML118 bridge amplifier that fed into a Powerlab 8 SP high-performance data acquisition system (ADInstruments Ltd. by Phymep, Paris, France).

Heart mitochondrial function. MITOCHONDRIAL RESPIRATION STUDIES. Mouse heart was placed in isolation buffer A containing (in mmol/l): sucrose 300, TES 5, EGTA 0.2, pH 7.2 (4°C). The tissue was finely minced and homogenized by the use of a Kontes tissue grinder. After 800-*g* centrifugation for 5 min, supernatant was centrifuged at 8,800 *g* for 5 min. Mitochondrial pellet was resuspended in buffer A and centrifuged one more time at 8,800 *g* for 5 min. Protein concentration was determined according to the Bradford method. Purity and integrity of isolated mitochondria were assessed by measuring specific activities of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase, as an endoplasmic reticulum marker enzyme, and cytochrome c oxidase, as an inner membrane marker enzyme (19).

For respiration studies, 200 μg/ml mitochondria were suspended in respiration medium MiR05 (20). The following parameters of mitochondrial respiration (Oroboros, Innsbruck, Austria) were evaluated: state 4 respiration rate (oxygen

uptake with glutamate 5 mmol/l malate 2 mmol/l in the absence of exogenous ADP; pmol oxygen/s/mg); state 3 respiration rate (oxygen uptake during ADP 1 mmol/l phosphorylation; pmol oxygen/s/mg); and respiratory control ratio (RCR): ratio of state 3 and state 4 oxygen uptake rates. In addition, we distinguish respiration with glutamate malate as flux through the respiratory chain from complex I to IV and respiration with *N,N,N′,N′*-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) (0.5 mmol/l) + ascorbate (2 mmol/l) (after rotenone complex I inhibition) as maximum flux through the isolated step of complex IV (20).

MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION AND TRANSMEMBRANE POTENTIAL. These parameters were assessed following Ca^{2+} overload as previously described (14,21). In

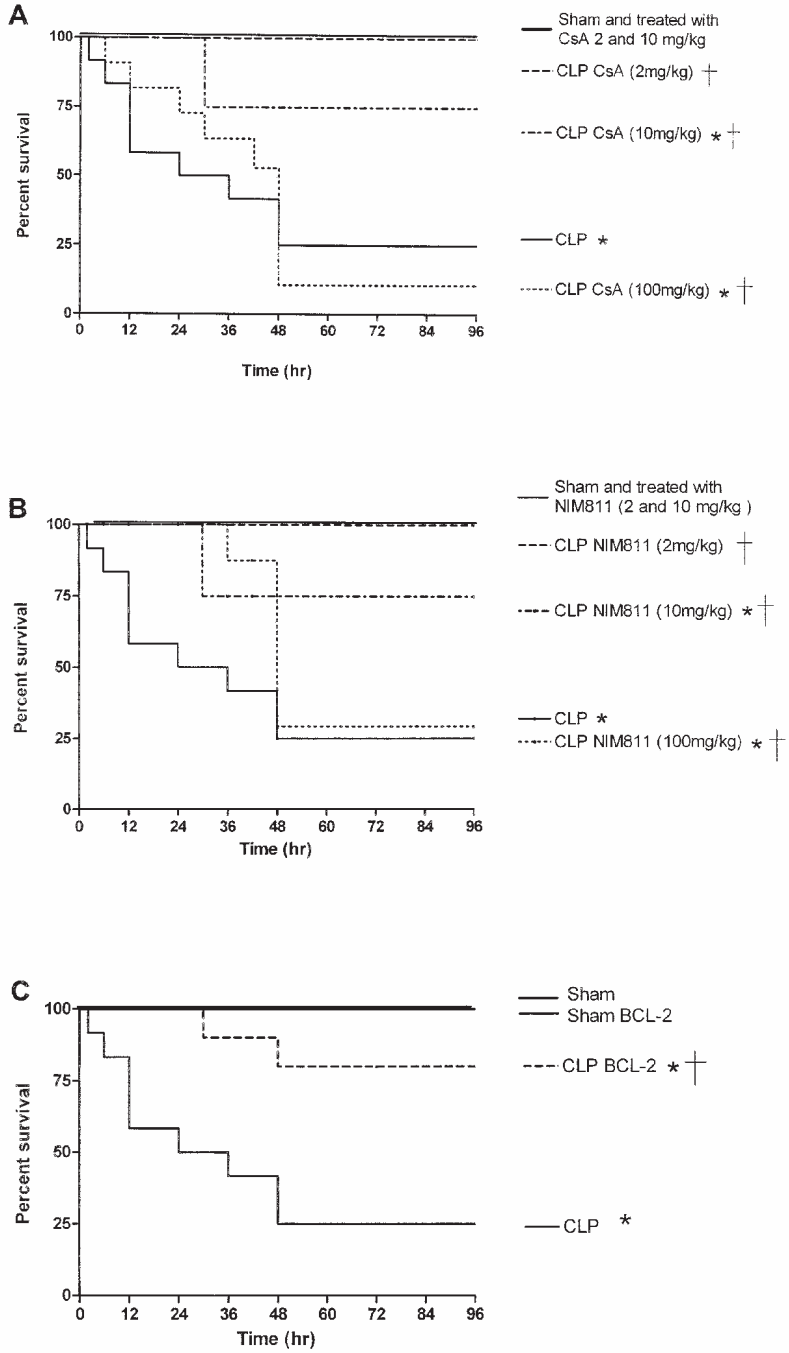


Figure 1. Survival rate of different groups of mice: survival rate of mice undergoing cecal ligation and puncture without treatment (CLP) was compared with that of animals treated with 2, 10, and 100 mg/kg cyclosporine A **(A)** or N-methyl-4-isoleucine cyclosporine (NIM811) **(B)**. Mice overexpressing B cell leukemia (Bcl)-2 had a survival rate of 80% **(C)**. Sample size is 12 in each group. Survival studies were conducted twice. *$p < 0.05$, sham versus treatment or transgenic CLP mice; †$p < 0.05$, CLP versus treatment or transgenic CLP mice, by Kaplan-Meier, log-rank.

brief, isolated mitochondria (1 mg/ml proteins) were suspended in buffer C (in mmol/l): sucrose 250; Tris-MOPS 10; glutamate-Tris 5; malate-Tris 2; Pi-Tris 1; EGTA-Tris 0.02; pH 7.4 at 25°C in a multiport measurement chamber (NOCHM-4, WPI, Aston, United Kingdom) equipped with Ca^{2+}, tetraphenylphosphonium (TPP^+)-selective microelectrodes, and reference electrodes (WPI), as previously described (14,21). First, mitochondria were gently stirred for 1.5 min in buffer C containing 1.5 μmol/l TPP^+ (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). At the end of the pre-incubation period, 10 μmol/l $CaCl_2$ administration was performed every 90 s with a micro syringe injector adapted to a Micro4 pump controller (UMPII and Micro4, WPI). Each 10-μmol/l $CaCl_2$ pulse was detected as a peak of extramitochondrial Ca^{2+} concentration. The Ca^{2+} is then very rapidly taken up by the mitochondria resulting in a return of extramitochondrial Ca^{2+} concentration to near baseline level (13,14). The mitochondrial transmembrane potential was estimated by calculating the transmembrane distribution of TPP^+. Transmembrane potential $\Delta\psi m$ was calculated as $59\log(v/V) - 59\log(10^{\Delta E/59} - 1)$, where v is matrix volume (1.1 μl/mg mitochondrial protein), V is volume chamber (1 ml), and ΔE is voltage difference before and after permeability transition pore opening and expressed in mV (21).

Lung injury. Mice were anesthetized (sodium pentobarbital 65 mg/kg IP) for bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue samples, and histological studies. In the first series of experiments, the lungs were harvested, weighed, and then dried to constant weight at 80°C over 48 h in an oven. To assess tissue edema, the wet/dry ratio was calculated. In the second series of experiments, BALF was harvested from the lung after tracheal intubation (percentage of fluid recovered: from 85% to 90%). Protein concentration in BALF was measured with the Bradford method. In the third series of experiments, lungs were harvested for myeloperoxidase (MPO) activity, which was used as an index of leukocyte infiltration. Briefly, after lung homogenate preparation, MPO activity was determined spectrophotometrically (650 nm) by measuring hydrogen peroxide-dependent oxidation of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (22). In the last series of experiments, lungs were fixed, embedded in paraffin, and the sections were stained with hematoxylin and eosin. Two observers, unaware of the nature of the experiment, scored the lung injury under light microscopy from 0 (no damage) to 4 (maximum damage), according to the combined assessment of alveolar congestion, hemorrhage, edema, infiltration/aggregation of neutrophils in the airspace or vessel wall, thickness of the alveolar wall, and hyaline membrane formation.

Plasma levels of nitrite/nitrate and immunoblotting. Plasma levels of nitrite/nitrate, an indicator of nitric oxide synthesis, were measured by the Griess reaction, as previously described (22).

Isolated mitochondrial protein (50 μg) was run on a 12% sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The proteins in the gel were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were treated with a rabbit polyclonal anti Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, California). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) secondary antibody (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were then washed, and bound antibodies were detected by the use of ECL Plus kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany) (23).

Caspase-like activities. After incubation in assay buffer containing (in mmol/l) HEPES 50, NaCl 100, EDTA 1,

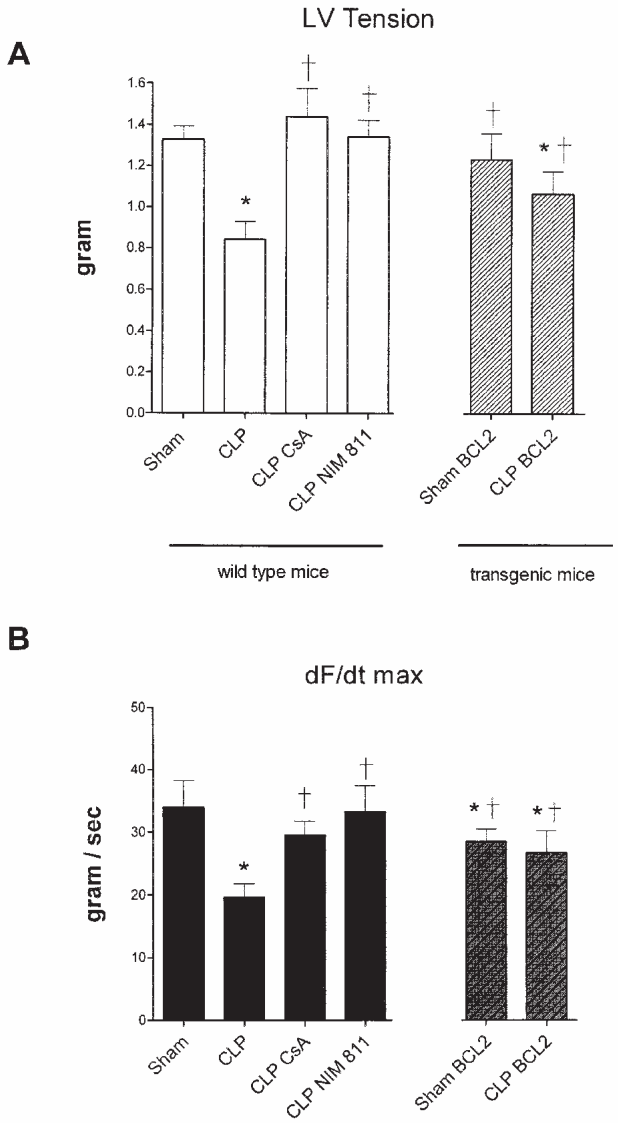


Figure 2. Cardiac function of sham and cecal ligation and puncture (CLP) wild-type mice and transgenic mice overexpressing B-cell leukemia (Bcl). **(A)** Left ventricular (LV) tension and **(B)** maximal increases in pressure (dF/dt max) values were recorded after a 30-min equilibration period. Sample size is 12 in each group. Results are expressed as means ± SEM and analyzed by means of one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison post hoc adjustment. *p = 0.005 versus sham mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons). †p = 0.005 versus CLP mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons). NIM811 = N-methyl-4-isoleucine cyclosporine.

DTT 10, with CHAPS 0,1% and Glycerol 10%, and in (μg/ml) aprotinin 10, leupeptin 10, and pepstatin 10 at pH 7.32, homogenized hearts were lysed with a Kontes Glass. Proteins (200 μg) were diluted in 200 μl of assay buffer; then either N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) or N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) (50 μmol/l; Biomol, Plymouth Meeting, Pennsylvania) was added. Sample fluorescence (excitation: 380 nm; emission 437 nm) was measured at 2 h (Spex Fluoromax, Isa-Horiba, Longjumeaux, France) (23).

Statistics. Results were analyzed with the SPSS for Windows software, version 11.0.1 (SPSS France, Paris-la-Défense, France). Data represent means ± SEM and were analyzed by analysis of variance procedures. When a significant difference was found, we identified specific differences between groups with a sequentially rejective Bonferroni procedure. After application of the Bonferroni correction, $p < 0.05$ was taken as a level of statistical significance. Survival was evaluated with Fisher exact test.

RESULTS

Sepsis model characteristics. In an independent series of experiments (n = 12 septic mice), we observed that wild-type mice began to die between 6 and 12 h after CLP surgery. Maximum mortality rate (75%) was observed 48 h after CLP and remained stable at 96 h. Mortality rate of 50% was achieved at 18 to 24 h. Consequently, physiological and biological studies were performed at this time point. At the time of sacrifice, all CLP mice exhibited clinical signs of sepsis, including severe hypoactivity and shivering. The amount of Bcl-2 in heart mitochondria of C57Bl/6 mice and Bcl-2 transgenic mice was assessed by Western blot analysis. The Bcl-2 mitochondrial protein levels of transgenic mice were three-fold higher than wild-type mice (data not shown).

Cyclosporine treatment and Bcl-2 overexpression improved survival in septic mice. Survival studies included 12 mice in each treatment group and were performed twice. To determine the effects of immunosuppressive and non-immunosuppressive analogs of cyclosporine, CsA, NIM811, and tacrolimus were injected in saline immediately after CLP surgery. Sham mice received equal doses of saline. As shown in Figures 1A and 1B, CsA (2 mg/kg) and NIM811 (2 mg/kg) fully protected mice against CLP-induced mortality. A consistent level of protection was obtained with CsA (10 mg/kg) and NIM811 (10 mg/kg), whereas a 100-mg/kg-dose regimen had deleterious effects on mortality rate in CLP mice (Figs. 1A and 1B). Tacrolimus FK 506 (a potent immunosuppressive drug that has no effects on mitochondrial permeability transition) (2 mg/kg) had deleterious effects on CLP-induced mortality (mortality rate < 8%; data not shown). Cyclosporine analogs had no effects on mortality rate in sham mice (Figs. 1A and 1B). In a separate series of experiments, CLP was initiated in Bcl-2 transgenic mice and wild-type mice as controls. The difference in survival between these two groups was apparent, because only 25% of the wild-type mice compared with 80% of the Bcl-2 transgenic mice were still alive 96 h after CLP (Fig. 1C).

Cyclosporine and Bcl-2 overexpression improved organ dysfunction in septic mice. Baseline heart contractile function was similar in wild-type and Bcl-2 transgenic mice (Figs. 2A and 2B). Cecal ligation and puncture induced significant myocardial contractile dysfunction in wild-type mice compared with wild-type sham mice. Treatments with cyclosporine analogs (CsA and NIM811; 2 mg/kg) reduced CLP-induced contractile dysfunction (Fig. 2A). The Bcl-2 transgenic mice were also protected against CLP-induced contractile dysfunction (Fig. 2B). Hearts from CLP-treated Bcl-2 transgenic mice (Fig. 2B) showed major increases in maximal, developed left ventricular pressure and dP/dt_{max} compared with CLP wild-type mice.

Effects of cyclosporine analogs (CsA and NIM811; 2 mg/kg) in CLP mice were evaluated on BALF protein concentration and lung wet/dry weight ratio, MPO activity, and histopathologic grading (Table 1). Treatments with CsA and NIM811 (2 mg/kg) in sham had no effects on the aforementioned lung function parameters (data not shown). Cyclosporine A and NIM811 (2 mg/kg) largely prevented CLP-induced increases in BALF protein concentration, lung MPO activity, and histological injury score (Table 1).

Cyclosporine and Bcl-2 overexpression improved mitochondrial function in septic heart. First, high purity and outer membrane integrity of isolated mitochondria were measured as undetectable activity levels of, respectively, NADPH-cytochrome c reductase, a specific reticulum

Table 1. Lung Injury Parameters in Sham and CLP Septic Mice

	Sham	CLP	CLP CsA	CLP NIM811
BALF* protein (μg/ml)	65 ± 8	125 ± 4†	80 ± 5†‡	75 ± 5†‡
Lung wet/dry ratio	4.60 ± 0.06	5.35 ± 0.34†	4.91 ± 0.06†	4.83 ± 0.03†
Lung MPO (OD_{650})	0.15 ± 0.04	0.61 ± 0.08†	0.32 ± 0.07†‡	0.28 ± 0.02†‡
Histology lung injury score	0.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5†	1.5 ± 0.5†‡	2.0 ± 0.5†‡

Score (0–4), on the basis of edema, hemorrhage, thickening of the alveolar wall, and infiltration of inflammatory cells into alveolar spaces. Sample size is 6 in each group. Results were analyzed with one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison post hoc adjustment. *Bronchoalveolar lavage fluid. †p = 0.008 versus sham mice (Bonferroni adjusted; six comparisons). ‡p = 0.008 versus CLP mice (Bonferroni adjusted; six comparisons).

BALF = bronchoalveolar lavage fluid; CLP = cecal ligation and puncture; CsA = cyclosporine A; MPO = homogenate myeloperoxidase activity; NIM811 = N-methyl-4-isoleucine cyclosporine; OD = optical density.

Table 2. Respiration Parameters and Membrane Potential of Isolated Heart Mitochondria

	Sham	CLP	CLP CsA	CLP NIM811	CLP BCL-2
State 4	37 ± 3	48 ± 2*	36 ± 3†	69 ± 8*†	86 ± 13*†
State 3	470 ± 77	299 ± 70*	434 ± 29†	555 ± 34*†	719 ± 20*†
RCR	9.7 ± 0.7	6.23 ± 0.3*	8.2 ± 1.3*†	8.0 ± 0.2*†	8.4 ± 0.9*†
Ascorbate TMPD	1688 ± 102	1782 ± 351	1432 ± 251	2302 ± 205*†	2689 ± 324*†
$\Delta\psi m$	−220 ± 6	−190 ± 12*	−207 ± 2	−208 ± 2	−215 ± 2

Sample size is 12 in each group. Results were analyzed with one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison post hoc adjustment. *$p < 0.005$ versus sham mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons). †$p < 0.005$ versus CLP mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons).

Ascorbate TMPD = *N,N,N,N'*-tetramethyl-p-phenylenediamine respiration rate (pmol oxygen/s/mg) with ascorbate (2 mmol/l) and TMPD (0.5 mmol/l) after rotenone complex I inhibition; $\Delta\psi m$ = mitochondrial membrane potential (mV); RCR = respiratory control ratio of state 3 and state 4 respiration rates; State 3 = respiration rate (pmol oxygen/s/mg) with adenosine diphosphate (ADP) (1 mmol/l); State 4 = respiration rate (pmol oxygen/s/mg) with glutamate (5 mmol/l) malate (2 mmol/l) in absence of exogenous ADP; other abbreviations as in Table 1.

marker enzyme, and cytochrome c oxidase, an inner membrane marker enzyme.

In C57Bl/6 wild-type CLP mice, RCR (increases in state 4 and reduction in state 3) at 18 h was reduced with no changes in maximum flux through the isolated step of complex IV dependent respiration (Table 2). In CLP mice, cyclosporine analog treatments and Bcl-2 overexpression resulted in improvement of RCR. Cyclosporine A reduced state 4 respiration and partially increased state 3 respiration, with no changes in maximum oxygen flux. The NIM811 treatment and Bcl-2 overexpression resulted in major increases in state 3 respiration, state 4 respiration, and maximum oxygen flux. In sham mice, cyclosporine analog-treated sham mice, and Bcl-2 transgenic sham mice, no changes in respiration parameters were observed 18 h after surgery (data not shown). In the cyclosporine analog-treated sham mice and Bcl-2 transgenic sham mice, mitochondrial membrane potential averaged −220 mV (data not shown). In CLP mice, mitochondrial membrane potential was unstable and averaged −190 mV (Table 2). Cyclosporine A or NIM811 CLP mice and CLP Bcl-2 transgenic mice had stable mitochondrial membrane potential, which averaged −210 mV (Table 2).

Representative examples of a mitochondrial permeability transition recording are displayed in Figure 3. The amount of Ca^{2+} added in the cuvette that was required to open the pore averaged 200 μmol/l in the sham mice, which corresponded to 200 nmol/mg mitochondrial protein (Fig. 4). A similar amount of Ca^{2+} was required to open the pore in cyclosporine analog-treated sham and Bcl-2 transgenic sham mice (data not shown). The Ca^{2+} overload was significantly reduced in CLP mice, averaging 60 μmol/l (Fig. 4). In CsA-treated or NIM811 CLP-treated mice and in CLP Bcl-2 transgenic mice, the Ca^{2+} overload required

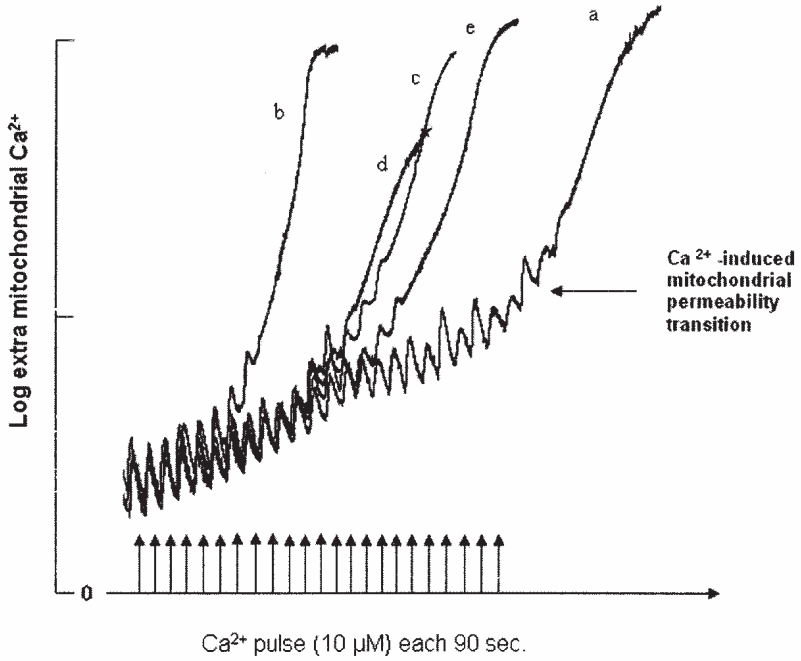


Figure 3. Representative example of mitochondrial permeability transition induced by calcium overload in preparation of isolated mitochondria. Recordings are displayed in one sham **(a)**, one cecal ligation and puncture (CLP) **(b)**, one cyclosporine-A–treated CLP **(c)**, one N-methyl-4-isoleucine cyclosporine (NIM811)-treated CLP **(d)**, and one CLP transgenic mouse **(e)**. In sham mice **(a)**, a Ca^{2+} load of 260 μmol/l (26 pulses of 10 μmol/l Ca^{2+}) was required to induce mitochondrial permeability transition versus 80 μmol/l Ca^{2+} (8 pulses of 10 μmol/l Ca^{2+}) in wild-type CLP mice.

JACC Vol. 48, No. 2, 2006
July 18, 2006:377–85

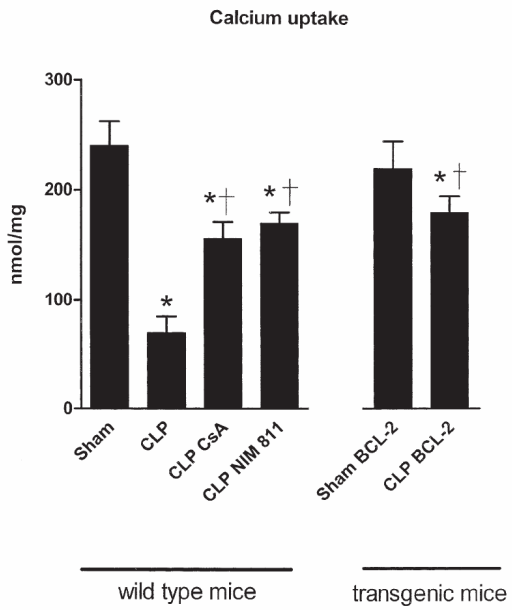


Figure 4. The Ca^{2+} load required for mitochondrial permeability transition in sham and CLP wild-type mice and mice overexpressing Bcl-2. Sample size is 12 in each group. Results are expressed as means ± SEM and analyzed by means of one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison post hoc adjustment. *p = 0.005 versus sham mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons). †p = 0.005 versus CLP mice (Bonferroni adjusted; ten comparisons). Abbreviations as in Figure 2.

for pore opening significantly increased when compared with CLP mice (Fig. 4).

Effects of cyclosporine and Bcl-2 overexpression on CLP-induced plasma nitrite/nitrate levels and effector caspase activation. Plasma levels of nitrite/nitrate, an indicator of NO synthesis, were not increased in CLP mice at 18 h (nitrite/nitrate 15 ± 3 μmol/l in sham vs. 22 ± 8 μmol/l in CLP mice). Neither cyclosporine analogs (i.e., CsA and NIM811) nor Bcl-2 overexpression resulted in changes in plasma nitrite/nitrate levels in CLP mice (nitrite/nitrate 18 ± 4 μmol/l, 16 ± 7 μmol/l, and 24 ± 3 μmol/l, respectively). Heart caspase-9–like activities, which were largely prevented by cyclosporine analog treatment and Bcl-2 overexpression in septic mice (Fig. 5), increased in CLP mice at 18 h. Similar caspase-3–like activity increases were detected in CLP mice at 18 h; these were also prevented by cyclosporine analog treatment and Bcl-2 overexpression.

DISCUSSION

Although regional and microvascular perfusion abnormalities undoubtedly occur (1,2), recent investigations indicate that metabolism is also altered at the cellular level during sepsis, which might result in impaired cellular use of oxygen and organ dysfunction (3). Because mitochondria use >90% of total body oxygen consumption to generate adenosine triphosphate, function of vital organs such as the heart could be impaired as a consequence of abnormalities in mitochondrial bioenergetic processes. Here, we report the new, important information that improvement of mitochondrial function via permeability transition inhibition reduces heart and lung dysfunction and mortality in septic mice. To the best of our knowledge, the present report is the first to demonstrate that mitochondrial permeability transition might be directly responsible for vital organ dysfunction and mortality in chronic septic in mice.

The immunosuppressant drug CsA, which interacts with cyclophilin D, inhibits mitochondrial permeability transition (14,15). In isolated mitochondria, CsA prevents swelling and increases mitochondrial calcium retention capacity (11–13). In vivo, the inhibitory effect of CsA emphasized the critical importance of permeability transition pore in organ injury induced by ischemia reperfusion. At micromolar concentrations, CsA might significantly decrease infarct size in ischemia reperfusion of the heart (14,15) and the brain (24), whereas millimolar concentrations might cause organ toxicity though excessive free radical generation (25). Likewise, findings from our study and from other groups (26) suggest that treatment with high doses of CsA exacerbates mortality in CLP septic mice. Conversely however, we (27) and other groups (6,28) have reported that lower concentrations of CsA might attenuate tissue injury and abnormalities in mitochondrial function and protect against endotoxin-mediated myocardial dysfunction. Here, we provide the first evidence that cyclosporine derivatives and Bcl-2 overexpression fully afforded CLP septic mice protection against heart and lung derangements, which was associated with increased survival rate.

Among the deleterious changes induced by sepsis on vital organ function, impaired myocardial performance is a well-documented feature that greatly contributes to mortality (1,2). Although sepsis is generally viewed as a disease aggravated by an inappropriate inflammatory response to bacteria, implication of apoptosis has been recently demonstrated in the pathogenesis of sepsis (29). Moreover, we have demonstrated that activation of heart apoptosis pathways might directly impede ventricular contractile function via caspase-induced sarcomere disarray (23). Here, our results suggest that mitochondrial permeability transition, a major event in apoptotic mitochondrial pathway (10), is implicated in septic ventricular contractile dysfunction via abnormalities in heart mitochondrial bioenergetics. Mitochondrial permeability transition and dissipation of membrane potential induced by CLP sepsis were associated with impaired respiratory capacity under phosphorylating conditions (state 3) and respiration increases under non-phosphorylating conditions (state 4), which lead to reduced RCR (state 3/state 4 respiratory rates). In contrast, reductions in RCR were prevented by cyclosporine analogs and overexpression of Bcl-2; this indicates global improvement of mitochondrial functional integrity. Our results are thus consistent with recent studies suggesting that sepsis-mediated mitochondrial injury correlates with impaired respiration efficacy of

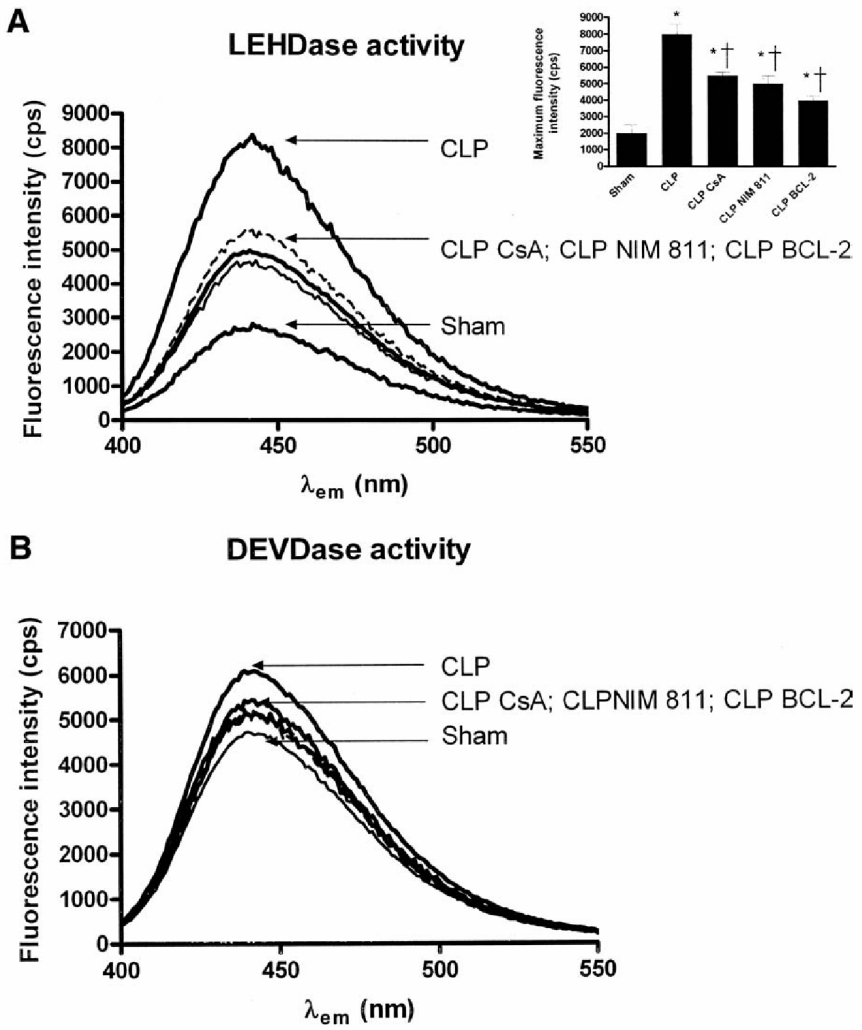


Figure 5. **(A)** Representative caspase-9–like (LEHDase) and **(B)** caspase-3–like (DEVDase) activities in heart left ventricle of sham and CLP wild-type mice and mice overexpressing Bcl-2. **Inset panel** presents LEHDase maximal fluorescence intensity (counts per second [cps]) measured (λem = 437 nm) as means ± SEM of in each group (sample size is 12 in each group). Results are analyzed by means of one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison post hoc adjustment. *p = 0.005 versus sham mice (Bonferroni adjusted; 10 comparisons). †p = 0.005 versus CLP mice (Bonferroni adjusted; 10 comparisons). Abbreviations as in Figure 2.

mitochondria, which was prevented by cyclosporine derivatives (6,28).

Limitations of the study are mainly that treatment with cyclosporine analogs and Bcl-2 overexpression might improve organ dysfunction and survival in sepsis through mechanisms independent of mitochondrial permeability transition. For example, overexpression of Bcl-2 and CsA treatment might be beneficial in different models of sepsis via reduction in proinflammatory mediator synthesis and lymphocyte apoptosis. Here, we observed that neither cyclosporine analogs nor overexpression of Bcl-2 in CLP mice altered plasma nitrite/nitrate and TNF-alpha (S. Lancel, unpublished data, January 2005) levels. Beneficial effects of treatment with cyclosporine analogs could also be attributed to their known effects on calcineurin pathways. However, the fact that CsA and NIM811 (a non-immunosuppressive drug that inhibits mitochondrial permeability transition) but not tacrolimus (a potent immunosuppressive drug that has no effects on mitochondrial permeability transition) were able to offer protection suggests that reduction in sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality rate is related to the unique effects of cyclosporine derivatives on the mitochondrial function. We have shown that, during endotoxemia, increased heart caspase-3–like activity could participate directly in myocardial dysfunction. Here, increases in caspase-9– and -3–like activities were detected in the hearts of CLP mice. Reduction in caspase-3–like activities in CLP mice treated with cyclosporine analogs and overexpression of Bcl-2 could account at least in part for observed beneficial effects on heart function.

In conclusion, our study provides strong evidence that septic vital organ dysfunction can be prevented by inhibiting mitochondrial permeability transition. Regarding the critical role of heart failure in the pathophysiology of septic shock, our study also indicates a potentially new therapeutic approach for treatment of sepsis syndrome.

Reprint requests and correspondence: Dr. Remi Neviere, Département de Physiologie, Faculté de Médecine 1, Place Verdun, Lille 59045 Lille, France. E-mail: rneviere@univ-lille2.fr.

REFERENCES

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001,29:1303–10.
2. Krishnagopalan S, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. Curr Opin Crit Care 2002;8:376–88.
3. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. Biochem Soc Symp 1999,66:149–66.
4. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. Crit Care Med 2002,30:276–84.
5. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet 2002,360:219–23.
6. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, et al. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. Crit Care Med 2004,32:478–88.
7. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004,286:R491–7.
8. Bernardi P, Petronelli V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. J Bioenerg Biomembr 1996;28:129–36.
9. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. Cardiovasc Res 2005;66:222–32.
10. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science 2004,305:626–9.
11. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature 2005,434:658–62.
12. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. J Biol Chem 1996;271:2185–92.
13. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. J Biol Chem 2005,280:18558–61.
14. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 2005;38:367–74.
15. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. Cardiovasc Res 2004;61:372–85.
16. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? J Neurosci Res 2005;79:231–9.
17. Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:296–301.
18. Tada H, Thompson CI, Recchia FA, et al. Myocardial glucose uptake is regulated by nitric oxide via endothelial nitric oxide synthase in Langendorff mouse heart. Circ Res 2000;86:270–4.
19. Plonne D, Cartwright I, Linss W, Dargel R, Graham JM, Higgins JA. Separation of the intracellular secretory compartment of rat liver and isolated rat hepatocytes in a single step using self-generating gradients of iodixanol. Anal Biochem 1999;276:88–96.
20. Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, et al. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286:H1633–41.
21. da Silva EM, Soares AM, Moreno AJ. The use of the mitochondrial transmembrane electric potential as an effective biosensor in ecotoxicological research. Chemosphere 1998;36:2375–90.
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;43:2348–58.
23. Lancel S, Joulin O, Favory R, et al. Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. Circulation 2005;111:2596–604.
24. Yu G, Hess DC, Borlongan CV. Combined cyclosporine-A and methylprednisolone treatment exerts partial and transient neuroprotection against ischemic stroke. Brain Res 2004;1018:32–7.
25. Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. FASEB J 2001;15:1291–3.
26. Iwamura H, Sato M, Wakitani K. Comparative study of glucocorticoids, cyclosporine A, and JTE-607 [(-)-Ethyl-N[3,5-dichloro-2-hydroxy-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]benzoyl] -L-phenylalaninate dihydrochloride] in a mouse septic shock model. J Pharmacol Exp Ther 2004;311:1256–63.
27. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulin O, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:449–55.
28. Crouser ED, Julian MW, Joshi MS, Bauer JA, Wewers MD, Hart JM, Pfeiffer DR. Cyclosporin A ameliorates mitochondrial ultrastructural injury in the ileum during acute endotoxemia. Crit Care Med 2002;30:2722–8.
29. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003;348:138–50.

DISCUSSION

Nous allons discuter dans un premier temps des modulations que nous avons pu oberver sur la microcirculation, qui confirment que les anomalies microcirculatoires sont modulables. Notamment, nous avons vu dans les résultats que les nouvelles informations que nous donnons sur le glycocalyx pourraient ouvrir de nouvelles voies de recherches notamment thérapeutiques.

Nous nous attarderons sur les effets bénéfiques cardiocirculatoires de la protéine C activée que nous avons vu dans nos résultats et qui sont à l'étude dans notre service de réanimation.

Nous essayerons de voir si les protocoles récents qui ont baissé la mortalité ont été positifs grace à la mitochondrie.

Nous nous poserons la question d'une réanimation guidée par la microcirculation ou la mitochondrie dans l'avenir.

Puis, nous donnerons des arguments pour notre théorie d'une dysfonction primitive de la mitochondrie et suggérer pourquoi nous pensons que ce n'est pas l'O2 qui est le principal point important dans la physiopathologie du choc septique, mais le potentiel de membrane de la mitochondrie qui est le vrai rhéostat.

Enfin, dans les perspectives, nous essayerons de proposer des moyens d'étayer cette théorie à la fois chez l'animal et chez l'homme.

III. MODULATION DE LA MICROCIRCULATION

1. Effets de la sédation

Les résultats de notre étude humaine chez des patients indemnes de pathologie microcirculatoire incitent à interpréter avec prudence les effets d'une thérapeutique réputée modifier la microcirculation dans le contexte d'une sédation concomitante. Il va de soit que pour certaines techniques de laboratoire ou certains gestes chez l'homme une sédation peut s'avérer nécessaire physiologiquement ou éthiquement. La tendance dans les unités de soins intensifs est l'allègement des doses de sédatifs ou morphiniques, notamment depuis l'arrivée de produits de demi-vie courte comme le rémifentanil. Une autre technique récente consiste à arrêter la sédation tous les jours jusqu'au réveil du patient.

Compte-tenu des effets sur l'hyperhémie, il semblerait que les morphiniques soient moins délétères que les benzodiazépines sur la microcirculation, dans les conditions de notre étude. Quoiqu'il en soit, il faut probablement tenir compte dans son interprétation de résultats concernant la microcirculation de l'effet propre des drogues sédatives et probablement standardiser les doses au moins pendant la période d'observation.

2. Effets de la protéine C activée

a. Chez l'animal

La protéine C activée réduit les lésions de la muqueuse gastrique dans un modèle de lésions induites chez le rat. Dans ce modèle, la protéine C activée diminue les taux plasmatiques de TNF-α, comme dans notre étude, les taux de prostaglandines gastriques, réduit l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et prévient la baisse du débit sanguin muqueux gastrique. Un inhibiteur de la thrombine n'a pas les mêmes effets et par contre l'administration d'anticorps anti-TNF-α a des effets (mesurés) similaires à la protéine C activée dans ce modèle[426].

Dans un modèle d'injection de LPS chez le hamster[427], une préparation de vidéomicroscopie intravitale cutanée permet de retrouver une diminution du rolling et de l'adhésion leucocytaire de l'ordre de 50% chez les hamsters traités par protéine C activée. Par

ailleurs, la protéine C activée prévient de façon significative la diminution de la densité capillaire.

L'implication du glycocalyx (article n°3) dans la physiopathologie de la dysfonction microcirculatoire nous semble importante dans notre modèle.

Premièrement, un traitement par la **hyaluronidase** induit des altérations capillaires chez le hamster[428]: diminution de la densité capillaire, augmentation de l'hématocrite et du flux des GR des capillaires restants.

Deuxièmement, le LPS induit dans notre modèle une diminution de la densité capillaire, une augmentation du nombre de capillaires obstrués, du nombre de stopped flow et une diminution des vaisseaux à flux continu, qui ne sont pas observés avec un prétraitement par la protéine C activée. Par ailleurs, la diminution de l'épaisseur du glycocalyx de façon parallèle à l'augmentation de sa dégradation (acide hyaluronique plasmatique) est prévenue par le pré-traitement par la protéine C activée.

Pour nous, cela prouve que **le glycocalyx a un rôle clef dans les perturbations microcirculatoires au cours du choc septique**. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que la dégradation du glycocalyx peut être prévenue par la protéine C activée. Il reste à regarder si

- Le glycocalyx joue le même rôle chez l'homme
- La protéine C activée peut moduler sa dégradation en traitement

b. Chez l'homme

In vitro, le dépôt et la perfusion de sérums issus de patients septiques sur des cellules endothéliales en culture permet de montrer que la protéine C activée[429], à la dose correspondant au taux moyen de protéine C circulante de l'étude PROWESS, diminue l'adhésion et l'agrégation des neutrophiles sur l'endothélium et diminue les interactions plaquettes/neutrophiles. L'adjonction d'héparine diminue ces effets bénéfiques et n'a par ailleurs pas d'effet si elle est donnée seule.

De Backer montre que la protéine C activée, par la méthode OPS améliore la microcirculation sublinguale au bout de 4 heures de perfusion en améliorant le nombre de capillaires perfusés de 20% avec un effet « on/off », c'est-à-dire une réaggravation du nombre de vaisseaux de petits calibres perfusés 4 heures après l'arrêt du produit[430]. Ce dernier point est probablement majeur :

- premièrement cela confirme s'il le fallait que ce qui est observé est réellement du à l'effet propre de la protéine C activée sur la microcirculation
- deuxièmement cela implique que l'effet n'est pas non plus préventif sur la synthèse de nouveaux médiateurs

Les effets que nous avons retrouvés au niveau de la microcirculation intestinale par vidéomicroscopie (article n°2 et n°3) confirment un effet bénéfique de la molécule sur le plan microcirculatoire. Les effets préventifs de la protéine C activée sur le marquage à la DHR 1, 2, 3 quasiment spécifique de l'implication de péroxynitrite, suggèrent un effet de prévention de la synthèse de péroxynitrite par la protéine C activée. Cette voie radicalaire expliquerait peut-être l'effet bénéfique précoce sur la microcirculation et sur la macrocirculation que nous trouvons chez le patient en état de choc septique sous protéine C activée.

IV. EFFETS CARDIOCIRCULATOIRES DE LA PROTEINE C ACTIVEE

1. Etudes animales

Contrairement à la thrombine, *in vitro* la protéine C n'a pas d'effet sur le tonus vasculaire sur des aortes de rat ou de lapin[431]. La première étude chronologique japonaise[432] utilise chez le rat une injection d'endotoxine à par voie intraveineuse. La protéine C activée a un effet préventif de l'hypotension artérielle dans ce modèle. Leurs données suggèrent que le TNF-α semble avoir un rôle causal dans l'hypotension artérielle causée par l'endotoxine dans ce modèle, par le biais de l'induction de l'iNOS. D'autre part, l'action de la protéine C activée dans ce modèle ne passe pas par un effet antithrombine, mais fort probablement par le biais d'une activité « sérine protéase » de la protéine C activée.

L'étude de Wiel[433] s'est intéressée aux effets d'un bolus de protéine C activée de 2mg/kg 1 heure après une injection de LPS chez le lapin. Ils ont étudiés après 5 jours la réactivité vasculaire *in vitro* sur anneaux aortiques isolés ainsi que des paramètres hématologiques, d'hémostase et d'hématose, ont mesuré l'activité du facteur tissulaire sur des monocytes in vitro et ont fait une étude d'immunohistochimie. Les paramètres hématologiques : leucocytes avec formule, hémoglobine, plaquettes, taux de prothrombine, fibrinogène, facteurs II, V et

VII+X sont comparables entre les groupes. La surface de lésions de l'endothélium aortique abdominal par étude immunohistochimique avec marquage PECAM1/CD31 passe de 40% dans le groupe LPS à 28% dans le groupe traité par PCA. La PCA restaure dans le groupe LPS la différence de sensibilité à la phényléphrine entre les anneaux aortiques avec et sans endothélium. Les résultats après incubation avec du L-NAME inhibant les NO synthases, c'est-à-dire une récupération pour le groupe LPS d'une sensibilité à la phényléphrine comparable aux contrôles et pas d'effet sur le groupe LPS+PCA suggèrent que cette différence est due à l'activité de NO synthases.

La réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante des anneaux aortiques est diminuée dans le groupe LPS par rapport aux contrôles, et de façon intéressante, cette vasodilatation est encore moins forte dans le groupe LPS+PCA. Les réponses en vasodilatation endothéliale-dépendante récepteur-indépendante (calcium ionophore A23187) et celle en vasodilatation endothéliale-indépendante au nitroprussiate de sodium sont par contre comparables entre les différents groupes. Ceci suggère une altération du couplage entre le récepteur à l'acétylcholine et les NO synthases et/ou une réduction de la production de NO par l'endothélium.

Dans notre modèle de rat endotoxinique nous avons montré que la protéine C activée donnée en prétraitement dans ce modèle permettait de prévenir la dysfonction ventriculaire gauche *ex vivo* (article n°2), la baisse de la pression artérielle (article n°2) et de rétablir la vasoréactivité à la noradrénaline (article n°3). Ces effets bénéfiques peuvent être en partie expliqués par un effet anti-inflammatoire. Le TNF-α par exemple, est beaucoup moins augmenté chez les rats prétraités par la protéine C activée avant injection de LPS. L'activation de l'iNOS pourrait de ce fait être moindre et diminuer les taux de NO circulant (article n°2). Une autre explication plausible de cet effet bénéfique pourrait être une diminution du stress oxydatif, comme en témoigne la moindre augmentation des marqueurs de ce stress par différentes techniques (article n°3). La dégradation des catécholamines par le stress oxydatif ne semble pas être la bonne hypothèse (article n°3), puisque leur taux plasmatique est inchangé, mais la diminution des taux de dérivés plasmatiques du NO (article n°2) et la baisse du marquage à la DHR 1,2,3 (article n°3) suggèrent l'implication du peroxynitrite.

2. Etudes humaines

a. Modèles d'endotoxinemie chez le volontaire sain

Deux études ont été conduites [434],[435] et discutées par la suite[436;437]. La première, en 2003, étudie 15 patients dans le bras traitement et 10 patients dans le groupe placebo. L'étude est de type randomisé. La dose de protéine C activée utilisée est de 24 µg/kg/heure c'est-à-dire même dose que dans l'étude PROWESS. Le LPS (d'Escherichia coli) est injecté par bolus à la dose de 2ng/kg 2 heures après le début de la perfusion de protéine C activée. On est donc là aussi en situation de prétraitement. Le point crucial est que les patients reçoivent une **perfusion de Na Cl à la dose de 200 ml/h**. Les paramètres hémodynamiques simples : fréquence **cardiaque, pression artérielle systolique et diastolique, ne sont pas significativement différents entre le groupe protéine C activée et placebo**. Si on regarde de plus près les résultats, on a quand même l'impression d'une tendance à H5 pour la pression artérielle systolique dont la barre d'erreur haute du groupe protéine C activée est plus basse que la barre d'erreur basse du groupe placebo. D'autre part l'étude ne compare que 15 versus 9 patients, et la baisse de pression artérielle dans ce modèle d'endotoxinémie « réanimée » par du remplissage continu n'est pas très forte, diminuant d'autant les chances d'observer une différence avec le traitement.

Dans l'étude de Kalil par contre, le remplissage beaucoup moins important permet sans doute d'observer une différence significative de pression artérielle moyenne à H3 entre volontaires sains avec ou sans protéine C activée.

De plus, il faut noter que le modèle d'endotoxinémie chez le volontaire sain est évidemment délibérément à petite dose. La dose de LPS comme on l'a vu à propos de l'activité sur l'endothélium est un pourtant un facteur à prendre en considération. Ainsi une étude hollandaise montre en 2005 que dans le modèle d'endotoxinémie chez le volontaire sain, il n'y a pas de trouble de la perméabilité vasculaire[438], alors que ce trouble est marqué dans les modèles animaux.

b. Données en clinique humaine

L'équipe de Teboul retrouve dans un étude cas/témoins une amélioration hémodynamique liée pour eux à la protéine C activée[439]. Cette étude rétrospective regarde les différences en pression artérielle moyenne et en doses de noradrénaline nécessaires pour maintenir une même pression artérielle moyenne entre deux groupes de patients cas/témoins appariés suivant des critères de gravité. Les patients contrôles sont des patients traités dans leur service avant la disponibilité de la protéine C activée. Les biais possibles de cette étude sont la définition du temps zéro pour l'étude des modifications des paramètres hémodynamiques d'une part, et d'autre part le fait qu'en plusieurs heures d'étude, il devient difficile de dire si la protéine C activée a réellement un effet hémodynamique direct. D'un côté il se peut que les patients s'améliorent pour d'autres raisons : remplissage, effet des antibiotiques…, de l'autre côté, les patients peuvent s'améliorer sans que ce soit un effet direct de la protéine C sur l'endothélium, les cellules musculaires lisses etc. Par exemple, la protéine C activée diminue le TNF-α, d'autres cytokines, et peut donc avoir un effet indirect sur l'amélioration vasculaire.

Dans l'étude PROWESS, les organes dont les dysfonctions s'améliorent le plus vite sont la dysfonction hémodynamique et la dysfonction respiratoire[440].

Une étude est en cours dans notre service chez des patients en état de choc septique chez qui, quand nous décidons de mettre en route un traitement par protéine C activée sont étudiés les paramètres suivants :

- Dose-réponse de pression artérielle en fonction de la dose de phényléphrine juste avant, à 30 minutes et à 1 heure du début de la perfusion de la protéine C activée
- Etude laser-doppler cutané avec épreuve d'hyperhémie réactionnelle juste avant, à 30 minutes et à 1 heure du début de la protéine C activée
- Dosage de catécholamines, cyokines, facteur Von Willebrandt, acide hyaluronique.

Les résultats préliminaires montrent une amélioration de la microcirculation cutanée à 30 minutes sous forme de récupération d'une vasomotion, de diminution de la durée de l'hyperhémie, avec parfois un pic d'hyperhémie plus élevé. D'autre part, pas à 30 minutes, mais à 1 heure du début de la perfusion de protéine C activée il existe une différence de réactivité dans la courbe dose-réponse pression artérielle / dose de phényléphrine. Par ailleurs ces effets circulatoires qu'il soit micro (au bout de 30 minutes) ou macro (au bout d'une heure) circulatoires suggèrent des mécanismes à réponse rapide, éliminant probablement des

effets anticoagulants, s'il fallait le souligner, et des effets de synthèse de médiateurs (type iNOS).

III. DEFAILLANCE MICROCIRCULATOIRE OU MITOCHONDRIALE ?

La dysfonction de la mitochondrie n'est pas contestée dans le sepsis. Ce qui pose en revanche question, c'est l'importance relative de cette dysfonction dans la physiopathologie du sepsis.

Pour l'équipe de Ince, la persistance d'anomalies microcirculatoires lors de conditions d'oxygénation normales ou normalisées incite à penser que c'est la microcirculation qui est le moteur du sepsis et non la mitochondrie. Dans cette hypothèse, si la microcirculation est trop longtemps pathologique, la mitochondrie le devient à son tour.

Il faut reconnaître que si un lien est démontré entre gravité des patients et degré d'atteinte de la mitochondrie dans l'étude de Brealey, rien ne prouve que ce soit un lien de cause à effet. Néanmoins, les résultats de Fink et les nôtres sur le potentiel de membrane mitochondrial incitent à penser que ce n'est pas forcément la PO2 qui devrait être le meilleur marqueur de l'atteinte mitochondriale. La dissipation du potentiel mitochondrial dans notre modèle physiopathologique précède potentiellement la baisse de la formation d'ATP. Ainsi pour nous, le facteur « oxygénation normale » n'élimine pas d'une part qu'une dysfonction mitochondriale soit déjà présente, d'autre part rien n'élimine la possibilité que ces anomalies mitochondriales puissent avoir un retentissement « en amont », sur la microcirculation. Par exemple, des ROS peuvent provenir de la mitochondrie, le fameux cycle Q au niveau du complexe I ou au niveau du complexe IV. Dans notre article n°3, nous observons un stress oxydatif qui est prévenu par la protéine C activée. Encore une fois, la difficulté d'analyse des études dans le choc septique s'impose : la protéine C activée agit-elle par le biais d'un effet sur la mitochondrie, d'une protection de l'endothélium (glycocalyx par exemple), ou simplement en atténuant la synthèse de médiateurs pléïotropes comme le TNF-α (comme nous l'avons vu dans notre article n°2) ? Les radicaux nitrogénés par exemple, peuvent avoir des

effets pléiotropes : inhibition de la chaîne respiratoire, effets pro-oxydants, vasodilatation, modification des récepteurs (ryanodine…) de façon réversible ou non, régulation des gènes…

Le NO et ses dérivés sont impliqués dans de nombreuses modifications liées au choc septique (dysfonction myocardique, réactivité vasculaire, mitochondrie…). L'échec en clinique d'inhibiteurs de NO synthases n'élimine pas son implication dans le choc septique biensûr. En effet, la régulation très fine suivant les différents types d'organes voire de cellules avec des localisations différentes dans des cavéoles par exemple, permet de penser que la dimension spatiale et temporelle du NO peut expliquer des effets diamétralement opposés (inotropisme cardiaque positif et négatif par exemple suivant la phase du choc endotoxinique).

Ces dérivés comme on l'a vu peuvent agir sur la mitochondrie et sur la microcirculation en même temps. C'est une des raisons pour lesquelles il est aussi difficile dans le contexte expérimental de se départir de l'influence, au moins potentielle, de la microcirculation sur la mitochondrie et inversement. La constatation d'anomalies microcirculatoires en imagerie par OPS par exemple n'élimine pas la présence d'anomalies mitochondriales biensûr.

Trouver laquelle des deux, microcirculation ou mitochondrie, est le moteur du sepsis est-il futile ? On pourrait *a priori* penser que finalement les deux atteintes sont présentes et qu'il faut essayer de corriger ces anomalies pour améliorer le pronostic des patients et que la savoir qui de la poule ou de l'œuf est responsable de quoi est la seule affaire d'hyperspécialistes. Cependant, à y bien regarder, il n'existe pas de preuve irréfutable qu'améliorer la microcirculation (ou la mitochondrie d'ailleurs) est bénéfique dans le choc septique. Les traitements qui ont prouvés une efficacité pour baisser la mortalité lors du choc septique : protéine C activée, hémisuccinate d'hydrocortisone, insuline, EGDT de Rivers peuvent avoir un effet bénéfique sur la microcirculation certes, mais est-ce cet effet là qui a abaissé la mortalité ? De plus, si c'est le cas, est-ce que cette amélioration de microcirculation est seule responsable de la baisse de mortalité ou parce que la mitochondrie est ainsi moins dysfonctionnante ?

IV. LES PROTOCOLES THERAPEUTIQUES RECENTS ONT-ILS ETE POSITIFS GRACE A LA MITOCHONDRIE ?

1. Early Goal Directed Therapy

Dans cette approche de réanimation intensive pendant les 6 premières heures du diagnostic de sepsis sévère, on peut imaginer que l'amélioration de l'hémodynamique générale et locale peut aider la mitochondrie à mieux fonctionner. On sait que le remplissage augmente la PO_2 tissulaire (vésicale) lors de l'endotoxinémie chez le rat[441] par exemple, mais rien ne nous dit que cette amélioration de PO_2 peut prévenir la détérioration mitochondriale. Par ailleurs, on sait que la mitochondrie peut être dysfonctionante dans les premières heures suivant une endotoxinémie : dans les 12 heures chez le babouin[442], dans les 24 heures chez le rat[443]. Chez l'homme l'équipe de Brealey les retrouve dans les 24 premières heures[444]. Une étude montre dans un modèle de CLP chez la souris que l'inhibition du cytochrome oxydase myocardique est dans un premier temps compétitif puis devient non compétitif après 48 heures[445]. Même si évidemment cette cinétique ne peut pas être translatée chez l'homme, le caractère « réversible » initial pourraît peser en faveur d'un effet « cinétique » de la réanimation initiale.

Est-ce que cette cinétique d'apparition rapide prouve un effet positif sur la mitochondrie dans l'étude de Rivers ? Non bien sûr et il faudrait au moins refaire une étude en couplant celle de Rivers et celle de Brealey pour avoir un début de réponse.

Que penser de ces résultats dans le contexte du MMDS ? Le volume de remplissage vasculaire important, même si ce n'est pas le seul facteur qui peut être impliqué dans l'effet positif dans l'étude de Rivers (transfusion de concentrés globulaires, dobutamine), n'est pas forcément bénéfique pour la microcirculation. Malheureusement dans l'étude du groupe MARS sur la microcirculation lors d'EGDT, les auteurs ont constaté une corrélation entre l'altération de la microcirculation et la gravité des patients, mais ils n'ont pas regardé par OPS si ce type de protocole thérapeutique pouvait avoir un effet bénéfique sur la microcirculation

chez un patient donné. C'est probablement un axe de recherche intéressant. En effet là aussi, même si on sait que la persistance d'anomalies microcirculatoires est un facteur de mauvais pronostic dans le choc septique, cela ne désigne pas forcément la microcirculation comme le seul responsable des dysfonctions d'organes multiples à venir.

2. Contrôle strict de la glycémie

L'étude princeps de Van den Berghe et co-auteurs en 2001[446] retrouvait une baisse de mortalité de 8% à 4.6% à un an et de 20.2% à 10.6% si le patient restait plus de 5 jours en soins intensifs. De façon intéressante, la baisse de mortalité se faisait essentiellement par le biais d'une baisse des décès par défaillance multiviscérale. Dans une étude par microcscopie électronique des patients qui sont décédés lors de l'étude princeps, il y avait moins de constatations de rupture physique de la mitochondrie[447]. Des anomalies mitochondriales hépatiques à type de modifications de la membrane interne des mitochondries sont rencontrées dans 78% des cas des patients contrôles et seulement dans 9% des cas des patients en insulinothérapie intensive. En utilisant également de la spectrophotométrie, ils démontrent aussi qu'il y a 89% d'activité du complexe I en plus et 40% d'activité du complexe IV en plus dans le groupe insulinothérapie intensive par rapport à insulinothérapie standard.

Il se pourrait qu'un des mécanismes de protection soit la baisse de la production de ROS liée à l'hyperglycémie. Mais une fois encore, la baisse des ROS peut également améliorer la microcirculation et pourquoi pas expliquer l'amélioration de la survie ? L'amélioration simultanée de la microcirculation et de la fonction mitochondriale n'est biensûr pas incompatible. Une des questions est de savoir si il y a un lien de cause à effet entre les deux, et si oui dans quel sens. Enfin un autre que facteur que la microcirculation ou la mitochondrie a pu être amélioré et améliorer à son tour certaines mitochondries.

V. FAUT-IL REANIMER LA MICROCIRCULATION ET COMMENT ?

On l'a vu, les études de ces dernières décennies ont utilisées des techniques de plus en plus performantes pour appréhender la microcirculation pathologique : laser-doppler, capnométrie sublinguale, imagerie par OPS, saturation tissulaire en oxygène.

Comme l'a montré De Backer, la persistance d'anomalies microcirculatoires sublinguales est un facteur de mauvais pronostic lors du choc septique et ces anomalies sont réversibles pharmacologiquement. Il nous manque biensûr maintenant des études évaluant l'efficaité de protocoles thérapeutiques avec pour cible l'amélioration de la microcirculation sur le pronostic des patients

1. la technique OPS sera-t-elle la méthode servant à réanimer la microcirculation demain ?

Quels sont les points faibles de cette technique :

- Acquisition de la technique
- Hétérogénéité des anomalies
- Reproductibilité
- Temps d'analyse
- Problème temporel : quand analyser le signal
- Problème spatial : où étudier la microcirculation et laquelle privilégier

2. La technique laser-doppler semble encore moins une bonne candidate pour la mesure et l'analyse rapide des signaux anormaux.

3. Que penser de la technique de saturation tissulaire musculaire en O2 ?

Malheureusement, cette technique ne permet pas pour l'instant chez l'homme d'avoir d'information sur l'état du cytochrome aa3. L'avantage qu'on pourrait y voir est la facilité

d'emploi et la réanimation d'un seul chiffre. La compliance des cliniciens serait forcément meilleure.

4. Quels objectifs de réanimation microcirculatoire ?

Cela pose aussi des problèmes de définir des « end-points » sur lesquels se baser de façon consensuelle, et d'avoir le temps de les atteindre. En effet quels objectifs définir, une valeur moyenne de patients « normaux », un pourcentage d'amélioration à atteindre chez le patient étudié ?

VI. MODULATION DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL

Nos deux modèles de dysfonction myocardique se caractérisent par l'activation de processus inflammatoires comme en témoigne l'augmentation du TNF-α (article n°2 et 4), des nitrates/nitrites et des myélopéroxydases (article n°2). De façon parallèle, les deux voies de l'apoptose sont activées (article n°4, 5 et 6).

Le TNF-α peut par exemple expliquer dans ce modèle une activation par la voie des récepteurs de mort (protéines adaptatrices TRADD et FADD au niveau du TNFR-1 qui conduisent à l'activation des procaspases-8), ou par l'activation des céramides/sphingosines (article n°4).

Nous avons montré que cette voie des céramides pouvait induire une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial de façon précoce (article n°4) et qu'elle pouvait être associée à la dysfonction myocardique *ex vivo*, et *in vitro*.

Que penser de cette apoptose myocardique ?

L'apoptose myocardique aboutissant à la mort elle-même n'est retrouvée dans notre modèle que dans moins de 1% des cardiomyocytes. Cela peut s'expliquer soit par un problème méthodologique, la technique TUNEL par exemple est peu sensible même si très spécifique.

Néanmoins, la **dissipation du potentiel de membrane mitochondriale** (article 4 et 6), la cinétique d'expression des facteurs régulateurs de l'apoptose mitochondriale (article n°5) sont en faveur de l'activation de l'apoptose par de multiples techniques.

D'autre part, le fait que la dysfonction myocardique soit temporaire dans ce modèle est un argument pour dire qu'il n'y a pas d'apoptose « complète » au sens strict du terme et est probablement à mettre en parallèle avec la dysfonction myocardique temporaire également chez l'homme. Pourtant, les caspases myocardiques sont activées dans ce modèle de façon indiscutable. Les caspases biensur sont des enzymes qui peuvent cliver plusieurs substrats autres que les nucléotides (actine, myosine…) et avoir des effets autres que l'apoptose au sens strict du terme. Cette activation des voies de l'apoptose peut avoir des effets pourquoi pas aussi sur la microcirculation. Cela n'a pas été étudié à notre connaissance.

Le myocarde est-il préservé de l'apoptose « complète » car sans moyen de régénération ? Est-il donc un bon modèle d'étude de la dysfonction mitochondriale des autres cellules dans le choc septique ? Nous n'avons pas la réponse à cette question car nous n'avons pas étudié ces phénomènes dans d'autres cellules comme les cellules endothéliales par exemple.

Par contre, un argument indirect est apporté par notre article n°6 où dans ce modèle de CLP chez la souris, la défaillance d'organe (poumon et cœur) et la mortalité est diminuée probablement grâce à l'inhibition de la transition de perméabilité mitochondriale. Ces résultats suggèrent que la mitochondrie, dans certaines conditions du moins, pourrait être un moteur du sepsis.

Les conséquences potentielles de cette activation de l'apoptose par la voie mitochondriale peuvent être l'altération de la phosphorylation oxydative et donc de la formation d'ATP par la dissipation des électrons liée à la transition de perméabilité de la mitochondrie, l'augmentation de la production de ROS qui peuvent encore amplifier ces phénomènes.

Une critique de nos résultats à faire est que dans l'article n°6, la cyclosporine et le NIM, un de ses dérivés ont peut-être eu des effets autres que mitochondriaux. Ces produits ont des effets connus par la voie des calcineurines. Notamment, ils peuvent baisser la synthèse de marqueurs proinflammatoires. Néanmoins, le FK-506 qui n'a pas d'effet sur le pore de transition mais les mêmes autres effets que les dérivés de la cyclosporine ne diminue ni la dysfonction cardiaque, ni la mortalité. De plus, l'utilisation de souris transgénique surexprimant Bcl2 va aussi dans le sens d'un rôle central du pore de transition dans nos résultats. L'effet délétère des doses fortes de ces dérivés n'a pas d'explication évidente mais n'élimine pas l'implication du pore de transition dans le modèle. De plus, la plus forte mortalité obtenue à fortes doses des dérivés de la cyclosporine dans notre modèle est à mettre en parallèle avec une aggravation simultanée du potentiel de membrane mitochondrial et n'est

donc pas rhédibitoire pour expliquer le gain de survie par l'effet inverse. Il est vrai aussi que le pore de transition de la mitochondrie est une « théorie imagée » en pleine mutation et qu'il ne faut pas le voie comme un pore inerte au sens strict du terme sur lequel tel ou tel médiateur pourraît se fixer et avoir une action univoque. Il faut souligner aussi que ces dérivés de la cyclosporine sont donnés en cotraitement et non en traitement. En d'autres termes, l'effet n'existe peut-être que dans ces conditions là. Cela n'exclue pas l'hypothèse d'un passage en « hibernation » de la cellule. En effet il est possible que si l'on empêche de façon préventive la dissipation du potentiel de membrane, la cellule n'ait pas « besoin » de se mettre en « hibernation » parce que sa chaîne respiratoire va fonctionner correctement.

De plus, il faut probablement prêter attention au fait que comme peuvent exister des unités microcirculatoires fragiles, peuvent exister des populations mélangées de mitochondries dysfonctionnates et hyperfonctionnantes comme cela a été montré dans le foie par Piantadosi[448], suggérant peut-être des « mitochondries fragiles ». Il n'est pas exclu que ce phénomène soit dû à l'âge des mitochondries puisqu'on sait que cet âge va jouer sur la résistance à la dissipation du potentiel de membrane.

VII. PERSPECTIVES : COMMENT PROUVER QUE L'ALTERATION DU POTENTIEL DE MEMBRANE DE LA MITOCHONDRIE EST LE MOTEUR DU SEPSIS ?

Pour prouver cette hypothèse de façon plus claire encore, quelle est la stratégie possible, à la fois chez l'animal et chez l'homme ?

1. Il nous faut un modèle avec une pression artérielle normale

2. Il nous faut une microcirculation la plus normale possible

C'est évidement une condition pour se séparer de l'hypothèse de la microcirculation étant le moteur du sepsis. Cela pose le problème du modèle. Chez l'homme, on peut imaginer d'avoir atteint des objectifs minimaux d'amélioration de la microcirculation. Il reste à définir lesquels et la durée de stabilisation minimale suffisante pour se départir de la responsabilité de la microcirculation dans les phénomènes mitochondriaux.

3. Il faut développer des techniques de mesure de potentiel de membrane mitochondrial

Pour dire que ce sont les anomalies du rhéostat du potentiel de membrane mitochondrial qui sont moteurs de la dysfonction de l'organe et pas l'O_2, il faut développer au laboratoire des techniques permettant de s'affranchir d'une baisse de PO_2 à l'entrée du système d'une part, et probablement réussir à évaluer la PO_2 mitochondriale en même temps que le potentiel de mambrane. Chez l'homme, on peut espérer développer des techniques permettant de mesurer le potentiel du cytochrome aa3 d'une part et des techniques pour mesurer par exemple le NADH en même temps qu'un marqueur de la PO_2 mitochondriale.

Une piste est l'étude de la pente initiale de la chute du signal de StO2 lors d'une occlusion chez l'homme par la technique de spectrophotométrie de proche infrarouge. En effet, cette pent reflète a priori la VO_2. La limite est bien sûr l'hétérognéité possible entre les différents territoires et ici il n'y a que le muscle qui est étudié.

Sur le plan thérapeutique, il faut aussi probablement se poser la question d'aider peut-être dans certaines conditions l'organisme ou du moins certains organes à rentrer, sortir, ou rester selon les cas en état d'hibernation. La mitochondrie est probablement impliquée de façon forte dans ces mécanismes lors du sepsis. Cette modulation médicamenteuse reste à déterminer. L'utilisation des béta-bloquants une fois l'épisode hypotensif résolu, l'hypothermie etc sont peut-être à étudier dans l'avenir. Avant tout, il faut probablement développer des marqueurs qui permettrait de savoir dans quelle situation exacte se trouve le patient à un moment donné pour adapter notre thérapeutique et d'abord ne pas nuire aux phénomènes adptatifs de l'organisme, sauf s'ils sont dépassés…

CONCLUSIONS

L'amélioration des techniques nous permet de mieux caractériser au laboratoire les tenants et les aboutissants du rôle que la mitochondrie joue dans la physiopathologie cellulaire du choc septique. Cette approche est pour l'instant beaucoup plus difficile au lit du patient. Peut-être, le développememnt de technique permettant de mesurer la réduction du cytochrome aa3, mais cela semble difficile…

Dans nos modèles il semble que, en prétraitement du moins, la mitochondrie puisse être responsable de l'apparition de défaillances d'organes.

La physiopathologie du choc septique reste complexe et sa compréhension reste partielle malgré tous les efforts consentis pour l'améliorer.

Les études qui ont un impact en terme de mortalité semblent jouer en amont de l'apparition de dysfonction d'organes, qu'elle soit microcirculatoire ou mitochondriale et la question de savoir si réverser ces anomalies (dérivés nitrés…) est bénéfique reste ouverte, ce d'autant qu'il est possible que ces dysfonctions soient adaptatives et qu'une fois qu'elle sont apparues, vouloir les réverser soit délétère. Cela peut peut-être expliquer que les études d'optimisation de l'hémodynamique trop tardives soient négatives.

Cela ouvre aussi le champ peut-être à l'utilisation, une fois les défaillances installées aux thérapeutiques favorisant la « cicatrisation » au sens large du terme des fonctions de l'organisme, voire à l'utilisation peut-être de médicaments comme les β-bloquants…

Améliorer la microcirculation n'a pas encore prouvée l'amélioration de la fonction d'organe, est-ce qu'on ne va pas avoir aussi un moins bon pronostic. En effet qu'est-ce qui est délétère dans la supramaximalisation chez Gattinoni ?

L'apport de nouvelles techniques ces dernières années nous permet d'être placés à une avancée nous permettant enfin de pouvoir tester chez l'homme des thérapeutiques actives sur la microcirculation et peut-être bientôt sur la mitochondrie. Gageons que la décennie prochaine apportera des débuts de réponse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, and M. Tomlanovich. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N.Engl.J.Med.* 345:1368-1377.

2. Sibbald, W. J., J. Marshall, N. Christou, M. Girotti, D. McCormack, O. Rostein, C. Martin, and J. Meakins. 1991. "Sepsis"--clarity of existing terminology ... or more confusion? *Crit Care Med.* 19:996-998.

3. Poeze, M., G. Ramsay, H. Gerlach, F. Rubulotta, and M. Levy. 2004. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care* 8:R409-R413.

4. Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655.

5. Rangel-Frausto, M. S., D. Pittet, M. Costigan, T. Hwang, C. S. Davis, and R. P. Wenzel. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273:117-123.

6. Sands, K. E., D. W. Bates, P. N. Lanken, P. S. Graman, P. L. Hibberd, K. L. Kahn, J. Parsonnet, R. Panzer, E. J. Orav, D. R. Snydman, E. Black, J. S. Schwartz, R. Moore, B. L. Johnson, Jr., and R. Platt. 1997. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 278:234-240.

7. Chalfin, D. B., M. E. Holbein, A. M. Fein, and G. C. Carlon. 1993. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. *JAMA* 269:249-254.

8. Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310.

9. Parrillo, J. E., M. M. Parker, C. Natanson, A. F. Suffredini, R. L. Danner, R. E. Cunnion, and F. P. Ognibene. 1990. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann.Intern.Med.* 113:227-242.

10. Hoyert, D. L., K. D. Kochanek, and S. L. Murphy. 1999. Deaths: final data for 1997. *Natl.Vital Stat.Rep.* 47:1-104.

11. Heyland, D. K., W. Hopman, H. Coo, J. Tranmer, and M. A. McColl. 2000. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med.* 28:3599-3605.

12. Perl, T. M., L. Dvorak, T. Hwang, and R. P. Wenzel. 1995. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA* 274:338-345.

13. Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N.Engl.J.Med.* 348:1546-1554.

14. Korosec, J. H., K. Jagodic, and M. Podbregar. 2006. Long-term outcome and quality of life of patients treated in surgical intensive care: a comparison between sepsis and trauma. *Crit Care* 10:R134.

15. Brun-Buisson, C., P. Meshaka, P. Pinton, and B. Vallet. 2004. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 30:580-588.

16. Groeneveld, A. B., J. J. Nauta, and L. G. Thijs. 1988. Peripheral vascular resistance in septic shock: its relation to outcome. *Intensive Care Med.* 14:141-147.

17. Dellinger, R. P. 2003. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med.* 31:946-955.

18. Rabuel, C. and A. Mebazaa. 2006. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med.* 32:799-807.

19. Hotchkiss, R. S. and I. E. Karl. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.* 348:138-150.

20. Thomas, L. 1972. Germs. *N.Engl.J.Med.* 287:553-555.

21. Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz, and R. A. Balk. 1987. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N.Engl.J.Med.* 317:653-658.

22. Abraham, E., R. Wunderink, H. Silverman, T. M. Perl, S. Nasraway, H. Levy, R. Bone, R. P. Wenzel, R. Balk, R. Allred, and . 1995. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 273:934-941.

23. Echtenacher, B., K. Weigl, N. Lehn, and D. N. Mannel. 2001. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect.Immun.* 69:3550-3555.

24. Fisher, C. J., Jr., J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein, and E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.* 334:1697-1702.

25. Fisher, C. J., Jr., J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein, and E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.* 334:1697-1702.

26. Hagberg, L., D. E. Briles, and C. S. Eden. 1985. Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to gram-negative infections. *J.Immunol.* 134:4118-4122.

27. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L. L. Moldawer. 2001. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 16:83-96.

28. O'Sullivan, S. T., J. A. Lederer, A. F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1995. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann.Surg.* 222:482-490.

29. Green, D. R. and H. M. Beere. 2000. Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature* 405:28-29.

30. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, B. D. Freeman, K. W. Tinsley, J. P. Cobb, G. M. Matuschak, T. G. Buchman, and I. E. Karl. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 27:1230-1251.

31. Oberholzer, C., A. Oberholzer, F. R. Bahjat, R. M. Minter, C. L. Tannahill, A. Abouhamze, D. LaFace, B. Hutchins, M. J. Clare-Salzler, and L. L. Moldawer. 2001. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:11503-11508.

32. Munford, R. S. and J. Pugin. 2001. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:316-321.

33. Mort, T. C. and N. S. Yeston. 1999. The relationship of pre mortem diagnoses and post mortem findings in a surgical intensive care unit. *Crit Care Med.* 27:299-303.

34. KROGH, A. 1919. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J.Physiol* 52:409-415.

35. Nilsson, H. and C. Aalkjaer. 2003. Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Mol.Interv.* 3:79-89, 51.

36. Tsai, A. G. and M. Intaglietta. 1993. Evidence of flowmotion induced changes in local tissue oxygenation. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 12:75-88.

37. Luft, J. H. 1966. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed.Proc.* 25:1773-1783.

38. Vink, H. and B. R. Duling. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ.Res.* 79:581-589.

39. van Haaren, P. M., E. VanBavel, H. Vink, and J. A. Spaan. 2005. Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 289:H2503-H2507.

40. Megens, R. T., S. Reitsma, P. H. Schiffers, R. H. Hilgers, J. G. De Mey, D. W. Slaaf, M. G. oude Egbrink, and M. A. van Zandvoort. 2007. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J.Vasc.Res.* 44:87-98.

41. Lipowsky, H. H. 2005. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 12:5-15.

42. Reitsma, S., D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. van Zandvoort, and M. G. oude Egbrink. 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 454:345-359.

43. Rapraeger, A. 1989. Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J.Cell Biol.* 109:2509-2518.

44. Ihrcke, N. S., L. E. Wrenshall, B. J. Lindman, and J. L. Platt. 1993. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol.Today* 14:500-505.

45. Pries, A. R., T. W. Secomb, and P. Gaehtgens. 2000. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* 440:653-666.

46. Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky. 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1672-H1680.

47. Rapraeger, A., M. Jalkanen, E. Endo, J. Koda, and M. Bernfield. 1985. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J.Biol.Chem.* 260:11046-11052.

48. Nandi, A., P. Estess, and M. H. Siegelman. 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J.Biol.Chem.* 275:14939-14948.

49. Weigel, P. H., V. C. Hascall, and M. Tammi. 1997. Hyaluronan synthases. *J.Biol.Chem.* 272:13997-14000.

50. Grammatikakis, N., A. Grammatikakis, M. Yoneda, Q. Yu, S. D. Banerjee, and B. P. Toole. 1995. A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J.Biol.Chem.* 270:16198-16205.

51. Das, S., T. B. Deb, R. Kumar, and K. Datta. 1997. Multifunctional activities of human fibroblast 34-kDa hyaluronic acid-binding protein. *Gene* 190:223-225.

52. Sperandio, M. 2006. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 273:4377-4389.

53. Koedam, J. A., E. M. Cramer, E. Briend, B. Furie, B. C. Furie, and D. D. Wagner. 1992. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J.Cell Biol.* 116:617-625.

54. Dole, V. S., W. Bergmeier, H. A. Mitchell, S. C. Eichenberger, and D. D. Wagner. 2005. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 106:2334-2339.

55. Jung, U. and K. Ley. 1997. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation.* 4:311-319.

56. Xiong, J. P., T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2003. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J.Thromb.Haemost.* 1:1642-1654.

57. Muller, A. M., M. I. Hermanns, C. Cronen, and C. J. Kirkpatrick. 2002. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp.Mol.Pathol.* 73:171-180.

58. Lopez, J. A. 1994. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 5:97-119.

59. Ruggeri, Z. M. 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J.Thromb.Haemost.* 1:1335-1342.

60. Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner, and R. K. Andrews. 2001. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb.Haemost.* 86:178-188.

61. Huxley, V. H. and F. E. Curry. 1991. Differential actions of albumin and plasma on capillary solute permeability. *Am.J.Physiol* 260:H1645-H1654.

62. Ueda, A., M. Shimomura, M. Ikeda, R. Yamaguchi, and K. Tanishita. 2004. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 287:H2287-H2294.

63. Vink, H. and B. R. Duling. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ.Res.* 79:581-589.

64. Vink, H., A. A. Constantinescu, and J. A. Spaan. 2000. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 101:1500-1502.

65. Constantinescu, A. A., H. Vink, and J. A. Spaan. 2003. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1541-1547.

66. Henry, C. B. and B. R. Duling. 2000. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H2815-H2823.

67. Lipowsky, H. H. 2005. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 12:5-15.

68. Pries, A. R. and T. W. Secomb. 2003. Rheology of the microcirculation. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 29:143-148.

69. Pries, A. R. and T. W. Secomb. 2005. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 289:H2657-H2664.

70. Florian, J. A., J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull, and J. M. Tarbell. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ.Res.* 93:e136-e142.

71. Mochizuki, S., H. Vink, O. Hiramatsu, T. Kajita, F. Shigeto, J. A. Spaan, and F. Kajiya. 2003. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285:H722-H726.

72. Gouverneur, M., J. A. Spaan, H. Pannekoek, R. D. Fontijn, and H. Vink. 2006. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 290:H458-2.

73. Constantinescu, A. A., H. Vink, and J. A. Spaan. 2003. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1541-1547.

74. van den Berg, B. M., H. Vink, and J. A. Spaan. 2003. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ.Res.* 92:592-594.

75. Mochizuki, S., H. Vink, O. Hiramatsu, T. Kajita, F. Shigeto, J. A. Spaan, and F. Kajiya. 2003. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285:H722-H726.

76. Florian, J. A., J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull, and J. M. Tarbell. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ.Res.* 93:e136-e142.

77. Henry, C. B. and B. R. Duling. 2000. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H2815-H2823.

78. Rubio-Gayosso, I., S. H. Platts, and B. R. Duling. 2006. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 290:H2247-H2256.

79. Constantinescu, A. A., H. Vink, and J. A. Spaan. 2001. Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280:H1051-H1057.

80. Vink, H., A. A. Constantinescu, and J. A. Spaan. 2000. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 101:1500-1502.

81. Shimada, K., M. Kobayashi, S. Kimura, M. Nishinaga, K. Takeuchi, and T. Ozawa. 1991. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn.Circ.J.* 55:1016-1021.

82. Tovar, A. M., D. A. de Mattos, M. P. Stelling, B. S. Sarcinelli-Luz, R. A. Nazareth, and P. A. Mourao. 2005. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim.Biophys.Acta* 1740:45-53.

83. Weiler, H. and B. H. Isermann. 2003. Thrombomodulin. *J.Thromb.Haemost.* 1:1515-1524.

84. Nathan, D. M., J. Lachin, P. Cleary, T. Orchard, D. J. Brillon, J. Y. Backlund, D. H. O'Leary, and S. Genuth. 2003. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 348:2294-2303.

85. Algenstaedt, P., C. Schaefer, T. Biermann, A. Hamann, B. Schwarzloh, H. Greten, W. Ruther, and N. Hansen-Algenstaedt. 2003. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes* 52:542-549.

86. Du, X. L., D. Edelstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, and M. Brownlee. 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J.Clin.Invest* 108:1341-1348.

87. Nieuwdorp, M., T. W. van Haeften, M. C. Gouverneur, H. L. Mooij, M. H. van Lieshout, M. Levi, J. C. Meijers, F. Holleman, J. B. Hoekstra, H. Vink, J. J. Kastelein, and E. S. Stroes. 2006. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 55:480-486.

88. Nieuwdorp, M., H. L. Mooij, J. Kroon, B. Atasever, J. A. Spaan, C. Ince, F. Holleman, M. Diamant, R. J. Heine, J. B. Hoekstra, J. J. Kastelein, E. S. Stroes, and H. Vink. 2006. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 55:1127-1132.

89. Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky. 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1672-H1680.

90. Rubio-Gayosso, I., S. H. Platts, and B. R. Duling. 2006. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 290:H2247-H2256.

91. Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky. 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1672-H1680.

92. Nieuwdorp, M., M. C. Meuwese, H. Vink, J. B. Hoekstra, J. J. Kastelein, and E. S. Stroes. 2005. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 16:507-511.

93. Hjalmarsson, C., B. R. Johansson, and B. Haraldsson. 2004. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvasc.Res.* 67:9-17.

94. Rostgaard, J. and K. Qvortrup. 1997. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc.Res.* 53:1-13.

95. Rostgaard, J. and K. Qvortrup. 2002. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier? *Cells Tissues.Organs* 170:132-138.

96. Vink, H. and B. R. Duling. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ.Res.* 79:581-589.

97. Henry, C. B. and B. R. Duling. 2000. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H2815-H2823.

98. Henry, C. B. and B. R. Duling. 1999. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am.J.Physiol* 277:H508-H514.

99. Vink, H. and B. R. Duling. 2000. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278:H285-H289.

100. Rubio-Gayosso, I., S. H. Platts, and B. R. Duling. 2006. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 290:H2247-H2256.

101. Constantinescu, A. A., H. Vink, and J. A. Spaan. 2003. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1541-1547.

102. Nieuwdorp, M., H. L. Mooij, J. Kroon, B. Atasever, J. A. Spaan, C. Ince, F. Holleman, M. Diamant, R. J. Heine, J. B. Hoekstra, J. J. Kastelein, E. S. Stroes, and H. Vink. 2006. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 55:1127-1132.

103. Florian, J. A., J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull, and J. M. Tarbell. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ.Res.* 93:e136-e142.

104. Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky. 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1672-H1680.

105. Florian, J. A., J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull, and J. M. Tarbell. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ.Res.* 93:e136-e142.

106. Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky. 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1672-H1680.

107. van Zandvoort, M., W. Engels, K. Douma, L. Beckers, E. M. Oude, M. Daemen, and D. W. Slaaf. 2004. Two-photon microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study. *J.Vasc.Res.* 41:54-63.

108. Prabhu, S. D. 2004. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ.Res.* 95:1140-1153.

109. Communal, C., M. Sumandea, P. de Tombe, J. Narula, R. J. Solaro, and R. J. Hajjar. 2002. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6252-6256.

110. Granton, J. T., C. M. Goddard, M. F. Allard, S. van Eeden, and K. R. Walley. 1997. Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 155:1977-1983.

111. Supinski, G. S. and L. A. Callahan. 2006. Polyethylene glycol-superoxide dismutase prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173:1240-1247.

112. Lush, C. W. and P. R. Kvietys. 2000. Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation.* 7:83-101.

113. Chagnon, F., C. N. Metz, R. Bucala, and O. Lesur. 2005. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ.Res.* 96:1095-1102.

114. Levy, R. J., D. A. Piel, P. D. Acton, R. Zhou, V. A. Ferrari, J. S. Karp, and C. S. Deutschman. 2005. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med.* 33:2752-2756.

115. Chagnon, F., M. Bentourkia, R. Lecomte, M. Lessard, and O. Lesur. 2006. Endotoxin-induced heart dysfunction in rats: assessment of myocardial perfusion and permeability and the role of fluid resuscitation. *Crit Care Med.* 34:127-133.

116. Abi-Gerges, N., B. Tavernier, A. Mebazaa, V. Faivre, X. Paqueron, D. Payen, R. Fischmeister, and P. F. Mery. 1999. Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:1196-1204.

117. Silverman, H. J., R. Penaranda, J. B. Orens, and N. H. Lee. 1993. Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med.* 21:31-39.

118. Tavernier, B., D. Garrigue, C. Boulle, B. Vallet, and P. Adnet. 1998. Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits. *Cardiovasc.Res.* 38:472-479.

119. Tavernier, B., J. M. Li, M. M. El Omar, S. Lanone, Z. K. Yang, I. P. Trayer, A. Mebazaa, and A. M. Shah. 2001. Cardiac contractile impairment associated with increased phosphorylation of troponin I in endotoxemic rats. *FASEB J.* 15:294-296.

120. Tavernier, B., A. Mebazaa, P. Mateo, S. Sys, R. Ventura-Clapier, and V. Veksler. 2001. Phosphorylation-dependent alteration in myofilament ca2+ sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:362-367.

121. Layland, J., A. C. Cave, C. Warren, D. J. Grieve, E. Sparks, J. C. Kentish, R. J. Solaro, and A. M. Shah. 2005. Protection against endotoxemia-induced contractile dysfunction in mice with cardiac-specific expression of slow skeletal troponin I. *FASEB J.* 19:1137-1139.

122. Shah, A. M. and P. A. MacCarthy. 2000. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol.Ther.* 86:49-86.

123. Barraud, D., V. Faivre, T. Damy, S. Welschbillig, E. Gayat, C. Heymes, D. Payen, A. M. Shah, and A. Mebazaa. 2007. Levosimendan restores both systolic and diastolic cardiac performance in lipopolysaccharide-treated rabbits: comparison with dobutamine and milrinone. *Crit Care Med.* 35:1376-1382.

124. Faivre, V., H. Kaskos, J. Callebert, M. R. Losser, P. Milliez, P. Bonnin, D. Payen, and A. Mebazaa. 2005. Cardiac and renal effects of levosimendan, arginine vasopressin, and norepinephrine in lipopolysaccharide-treated rabbits. *Anesthesiology* 103:514-521.

125. Morelli, A., S. De Castro, J. L. Teboul, M. Singer, M. Rocco, G. Conti, L. De Luca, E. Di Angelantonio, A. Orecchioni, N. G. Pandian, and P. Pietropaoli. 2005. Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression. *Intensive Care Med.* 31:638-644.

126. Finkel, M. S., C. V. Oddis, T. D. Jacob, S. C. Watkins, B. G. Hattler, and R. L. Simmons. 1992. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257:387-389.

127. Ishida, H., K. Ichimori, Y. Hirota, M. Fukahori, and H. Nakazawa. 1996. Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.* 20:343-350.

128. Xie, Y. W., P. M. Kaminski, and M. S. Wolin. 1998. Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation. *Circ.Res.* 82:891-897.

129. Lancel, S., S. Tissier, S. Mordon, X. Marechal, F. Depontieu, A. Scherpereel, C. Chopin, and R. Neviere. 2004. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J.Am.Coll.Cardiol.* 43:2348-2358.

130. Lancel, S., O. Joulin, R. Favory, J. F. Goossens, J. Kluza, C. Chopin, P. Formstecher, P. Marchetti, and R. Neviere. 2005. Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 111:2596-2604.

131. Communal, C., M. Sumandea, P. de Tombe, J. Narula, R. J. Solaro, and R. J. Hajjar. 2002. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6252-6256.

132. Cunnion, R. E., G. L. Schaer, M. M. Parker, C. Natanson, and J. E. Parrillo. 1986. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 73:637-644.

133. Dhainaut, J. F., M. F. Huyghebaert, J. F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, and D. Raichvarg. 1987. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 75:533-541.

134. Winn, M. J., B. Vallet, N. K. Asante, S. E. Curtis, and S. M. Cain. 1993. Effects of NG-substituted arginines on coronary vascular function after endotoxin. *J.Appl.Physiol* 75:424-431.

135. Shibano, T. and P. M. Vanhoutte. 1993. Induction of NO production by TNF-alpha and lipopolysaccharide in porcine coronary arteries without endothelium. *Am.J.Physiol* 264:H403-H407.

136. Cannon, T. R., G. E. Mann, and A. R. Baydoun. 1998. Mechanisms of acute vasodilator response to bacterial lipopolysaccharide in the rat coronary microcirculation. *Br.J.Pharmacol.* 123:637-644.

137. Groeneveld, A. B., A. A. van Lambalgen, G. C. van den Bos, W. Bronsveld, J. J. Nauta, and L. G. Thijs. 1991. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc.Res.* 25:80-88.

138. Heuven-Nolsen, D., D. J. De Wildt, and F. P. Nijkamp. 1985. Disturbed adrenergic regulation of coronary flow in the guinea-pig heart after endotoxin. *Eur.J.Pharmacol.* 118:341-345.

139. Wang, S. Y., E. M. Cameron, M. P. Fink, and F. W. Sellke. 1997. Chronic septicemia alters alpha-adrenergic mechanisms in the coronary circulation. *J.Surg.Res.* 69:61-66.

140. Wang, S. Y., E. M. Cameron, M. P. Fink, and F. W. Sellke. 1997. Chronic septicemia alters alpha-adrenergic mechanisms in the coronary circulation. *J.Surg.Res.* 69:61-66.

141. Parker, J. L., R. S. Keller, D. V. Defily, M. H. Laughlin, M. J. Novotny, and H. R. Adams. 1991. Coronary vascular smooth muscle function in E. coli endotoxemia in dogs. *Am.J.Physiol* 260:H832-H841.

142. Kuo, L., W. M. Chilian, M. J. Davis, and M. H. Laughlin. 1992. Endotoxin impairs flow-induced vasodilation of porcine coronary arterioles. *Am.J.Physiol* 262:H1838-H1845.

143. Winn, M. J., B. Vallet, N. K. Asante, S. E. Curtis, and S. M. Cain. 1993. Effects of NG-substituted arginines on coronary vascular function after endotoxin. *J.Appl.Physiol* 75:424-431.

144. Hohlfeld, T., P. Klemm, C. Thiemermann, T. D. Warner, K. Schror, and J. R. Vane. 1995. The contribution of tumour necrosis factor-alpha and endothelin-1 to the increase of coronary resistance in hearts from rats treated with endotoxin. *Br.J.Pharmacol.* 116:3309-3315.

145. Mitchell, J. A., P. Gray, P. D. Anning, M. Woods, T. D. Warner, and T. W. Evans. 2000. Effects of nitric oxide-modulating amino acids on coronary vessels: relevance to sepsis. *Eur.J.Pharmacol.* 389:209-215.

146. Bogle, R. G., P. G. McLean, A. Ahluwalia, and P. Vallance. 2000. Impaired vascular sensitivity to nitric oxide in the coronary microvasculature after endotoxaemia. *Br.J.Pharmacol.* 130:118-124.

147. Cunnion, R. E., G. L. Schaer, M. M. Parker, C. Natanson, and J. E. Parrillo. 1986. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 73:637-644.

148. Dhainaut, J. F., M. F. Huyghebaert, J. F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, and D. Raichvarg. 1987. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 75:533-541.

149. Ince, C., J. F. Ashruf, J. A. Avontuur, P. A. Wieringa, J. A. Spaan, and H. A. Bruining. 1993. Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level. *Am.J.Physiol* 264:H294-H301.

150. Mulder, M. F., A. A. van Lambalgen, E. Huisman, J. J. Visser, G. C. van den Bos, and L. G. Thijs. 1994. Protective role of NO in the regional hemodynamic changes during acute endotoxemia in rats. *Am.J.Physiol* 266:H1558-H1564.

151. Yamamoto, S., H. P. Burman, C. P. O'Donnell, P. A. Cahill, and J. L. Robotham. 1997. Endothelin causes portal and pulmonary hypertension in porcine endotoxemic shock. *Am.J.Physiol* 272:H1239-H1249.

152. Fantini, G. A., S. Shiono, B. S. Bal, and G. T. Shires. 1989. Adrenergic mechanisms contribute to alterations in regional perfusion during normotensive E. coli bacteremia. *J.Trauma* 29:1252-1257.

153. Mitolo-Chieppa, D., M. Serio, M. A. Potenza, M. Montagnani, G. Mansi, S. Pece, E. Jirillo, and J. C. Stoclet. 1996. Hyporeactivity of mesenteric vascular bed in endotoxin-treated rats. *Eur.J.Pharmacol.* 309:175-182.

154. Fatehi-Hassanabad, Z., J. R. Parratt, and B. L. Furman. 1996. Endotoxin-induced inhibition of mesenteric vasodilator responses to acetylcholine, bradykinin, and post-occlusion hyperemia in anesthetized rats. *Shock* 6:371-376.

155. Piepot, H. A., C. Boer, A. B. Groeneveld, A. A. van Lambalgen, and P. Sipkema. 2000. Lipopolysaccharide impairs endothelial nitric oxide synthesis in rat renal arteries. *Kidney Int.* 57:2502-2510.

156. Walker, T. A., S. E. Curtis, C. E. King-VanVlack, C. K. Chapler, B. Vallet, and S. M. Cain. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 4:415-420.

157. Mitolo-Chieppa, D., M. Serio, M. A. Potenza, M. Montagnani, G. Mansi, S. Pece, E. Jirillo, and J. C. Stoclet. 1996. Hyporeactivity of mesenteric vascular bed in endotoxin-treated rats. *Eur.J.Pharmacol.* 309:175-182.

158. Suzuki, Y., E. A. Deitch, S. Mishima, W. N. Duran, and D. Z. Xu. 2000. Endotoxin-induced mesenteric microvascular changes involve iNOS-derived nitric oxide: results from a study using iNOS knock out mice. *Shock* 13:397-403.

159. Pannen, B. H., M. Bauer, J. X. Zhang, J. L. Robotham, and M. G. Clemens. 1996. A time-dependent balance between endothelins and nitric oxide regulating portal resistance after endotoxin. *Am.J.Physiol* 271:H1953-H1961.

160. Mastrangelo, D. and C. M. Pastor. 1999. Hepatic vascular response to norepinephrine during endotoxemia in anesthetized pigs. *Shock* 12:294-299.

161. Nishida, J., R. S. McCuskey, D. McDonnell, and E. S. Fox. 1994. Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am.J.Physiol* 267:G1135-G1141.

162. Gardiner, S. M., P. A. Kemp, J. E. March, and T. Bennett. 1995. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. *Br.J.Pharmacol.* 116:2005-2016.

163. Stevens, P. E., S. J. Gwyther, M. E. Hanson, J. E. Boultbee, W. J. Kox, and M. E. Phillips. 1990. Noninvasive monitoring of renal blood flow characteristics during acute renal failure in man. *Intensive Care Med.* 16:153-158.

164. Pastor, C. M. 1999. Vascular hyporesponsiveness of the renal circulation during endotoxemia in anesthetized pigs. *Crit Care Med.* 27:2735-2740.

165. Schwartz, D., M. Mendonca, I. Schwartz, Y. Xia, J. Satriano, C. B. Wilson, and R. C. Blantz. 1997. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J.Clin.Invest* 100:439-448.

166. Pastor, C. M. 1999. Vascular hyporesponsiveness of the renal circulation during endotoxemia in anesthetized pigs. *Crit Care Med.* 27:2735-2740.

167. Tsuneyoshi, I., Y. Kanmura, and N. Yoshimura. 1996. Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. *Crit Care Med.* 24:1083-1086.

168. Fantini, G. A., S. Shiono, B. S. Bal, and G. T. Shires. 1989. Adrenergic mechanisms contribute to alterations in regional perfusion during normotensive E. coli bacteremia. *J.Trauma* 29:1252-1257.

169. Guc, M. O., B. L. Furman, and J. R. Parratt. 1990. Endotoxin-induced impairment of vasopressor and vasodepressor responses in the pithed rat. *Br.J.Pharmacol.* 101:913-919.

170. Jones, J. J., J. A. Rapps, M. Sturek, M. L. Mattox, H. R. Adams, and J. L. Parker. 1999. Contractile function and myoplasmic free Ca2+ (Cam) in coronary and mesenteric arteries of endotoxemic guinea pigs. *Shock* 11:64-71.

171. Julou-Schaeffer, G., G. A. Gray, I. Fleming, C. Schott, J. R. Parratt, and J. C. Stoclet. 1990. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am.J.Physiol* 259:H1038-H1043.

172. Murray, P. T., M. E. Wylam, and J. G. Umans. 2000. Nitric oxide and septic vascular dysfunction. *Anesth.Analg.* 90:89-101.

173. Yamamoto, S., H. P. Burman, C. P. O'Donnell, P. A. Cahill, and J. L. Robotham. 1997. Endothelin causes portal and pulmonary hypertension in porcine endotoxemic shock. *Am.J.Physiol* 272:H1239-H1249.

174. Groeneveld, A. B., K. J. Hartemink, M. C. de Groot, J. Visser, and L. G. Thijs. 1999. Circulating endothelin and nitrate-nitrite relate to hemodynamic and metabolic variables in human septic shock. *Shock* 11:160-166.

175. Hollenberg, S. M., M. J. Piotrowski, and J. E. Parrillo. 1997. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to endothelin-1 in septic rats. *Am.J.Physiol* 272:R969-R974.

176. Stoclet, J. C., M. C. Martinez, P. Ohlmann, S. Chasserot, C. Schott, A. L. Kleschyov, F. Schneider, and R. Andriantsitohaina. 1999. Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* 100:107-112.

177. Landry, D. W., H. R. Levin, E. M. Gallant, R. C. Ashton, Jr., S. Seo, D. D'Alessandro, M. C. Oz, and J. A. Oliver. 1997. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 95:1122-1125.

178. Boveris, A., S. Alvarez, and A. Navarro. 2002. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic.Biol.Med.* 33:1186-1193.

179. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223.

180. Laubach, V. E., E. G. Shesely, O. Smithies, and P. A. Sherman. 1995. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:10688-10692.

181. MacMicking, J. D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q. W. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, and . 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81:641-650.

182. Watson, D., R. Grover, A. Anzueto, J. Lorente, M. Smithies, R. Bellomo, K. Guntupalli, S. Grossman, J. Donaldson, and J. R. Le Gall. 2004. Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med.* 32:13-20.

183. Reade, M. C., J. L. Millo, J. D. Young, and C. A. Boyd. 2005. Nitric oxide synthase is downregulated, while haem oxygenase is increased, in patients with septic shock. *Br.J.Anaesth.* 94:468-473.

184. Imai, T., T. Morita, T. Shindo, R. Nagai, Y. Yazaki, H. Kurihara, M. Suematsu, and S. Katayama. 2001. Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ.Res.* 89:55-62.

185. Favory, R., S. Lancel, S. Tissier, D. Mathieu, B. Decoster, and R. Neviere. 2006. Myocardial dysfunction and potential cardiac hypoxia in rats induced by carbon monoxide inhalation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 174:320-325.

186. Mazzola, S., M. Forni, M. Albertini, M. L. Bacci, A. Zannoni, F. Gentilini, M. Lavitrano, F. H. Bach, L. E. Otterbein, and M. G. Clement. 2005. Carbon monoxide pretreatment prevents respiratory derangement and ameliorates hyperacute endotoxic shock in pigs. *FASEB J.* 19:2045-2047.

187. Supinski, G. S. and L. A. Callahan. 2006. Hemin prevents cardiac and diaphragm mitochondrial dysfunction in sepsis. *Free Radic.Biol.Med.* 40:127-137.

188. Morisaki, H., T. Katayama, Y. Kotake, M. Ito, M. Handa, Y. Ikeda, J. Takeda, and M. Suematsu. 2002. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms. *Anesthesiology* 97:701-709.

189. Mayr, F. B., A. Spiel, J. Leitner, C. Marsik, P. Germann, R. Ullrich, O. Wagner, and B. Jilma. 2005. Effects of carbon monoxide inhalation during experimental endotoxemia in humans. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 171:354-360.

190. Sharshar, T., A. Blanchard, M. Paillard, J. C. Raphael, P. Gajdos, and D. Annane. 2003. Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med.* 31:1752-1758.

191. Brackett, D. J., C. F. Schaefer, P. Tompkins, L. Fagraeus, L. J. Peters, and M. F. Wilson. 1985. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. *Circ.Shock* 17:273-284.

192. Wilson, M. F., D. J. Brackett, L. B. Hinshaw, P. Tompkins, L. T. Archer, and B. A. Benjamin. 1981. Vasopressin release during sepsis and septic shock in baboons and dogs. *Surg.Gynecol.Obstet.* 153:869-872.

193. Wilson, M. F., D. J. Brackett, P. Tompkins, B. Benjamin, L. T. Archer, and L. B. Hinshaw. 1981. Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and E. coli shock. *Adv.Shock Res.* 6:15-26.

194. Landry, D. W., H. R. Levin, E. M. Gallant, R. C. Ashton, Jr., S. Seo, D. D'Alessandro, M. C. Oz, and J. A. Oliver. 1997. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 95:1122-1125.

195. Sharshar, T., A. Blanchard, M. Paillard, J. C. Raphael, P. Gajdos, and D. Annane. 2003. Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med.* 31:1752-1758.

196. Matsuoka, T. and D. H. Wisner. 1997. Hemodynamic and metabolic effects of vasopressin blockade in endotoxin shock. *Surgery* 121:162-173.

197. Brackett, D. J., C. F. Schaefer, and M. F. Wilson. 1983. The role of vasopressin in the maintenance of cardiovascular function during early endotoxin shock. *Adv.Shock Res.* 9:147-156.

198. Goldblatt, M. W. 1935. Properties of human seminal plasma. *J.Physiol* 84:208-218.

199. Moncada, S. and J. R. Vane. 1978. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacol.Rev.* 30:293-331.

200. Kozek-Langenecker, S. A., C. K. Spiss, A. Michalek-Sauberer, M. Felfernig, and M. Zimpfer. 2003. Effect of prostacyclin on platelets, polymorphonuclear cells, and heterotypic cell aggregation during hemofiltration. *Crit Care Med.* 31:864-868.

201. Lehmann, C., J. P. Konig, J. Dettmann, J. Birnbaum, and W. J. Kox. 2001. Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia. *Crit Care Med.* 29:1412-1416.

202. Oettinger, W., D. Berger, and H. G. Beger. 1987. The clinical significance of prostaglandins and thromboxane as mediators of septic shock. *Klin.Wochenschr.* 65:61-68.

203. Peters, K., R. E. Unger, J. Brunner, and C. J. Kirkpatrick. 2003. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc.Res.* 60:49-57.

204. Iversen, P. O., A. Nicolaysen, K. Kvernebo, H. B. Benestad, and G. Nicolaysen. 1999. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflugers Arch.* 439:93-100.

205. van Der, P. T. and S. F. Lowry. 1995. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 3:1-12.

206. Iversen, P. O., A. Nicolaysen, K. Kvernebo, H. B. Benestad, and G. Nicolaysen. 1999. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflugers Arch.* 439:93-100.

207. Pickkers, P., M. G. Netea, J. W. van der Meer, and P. Smits. 2002. TNFalpha and IL-1beta exert no direct vasoactivity in human isolated resistance arteries. *Cytokine* 20:244-246.

208. Glembot, T. M., L. D. Britt, and M. A. Hill. 1996. Endotoxin interacts with tumor necrosis factor-alpha to induce vasodilation of isolated rat skeletal muscle arterioles. *Shock* 5:251-257.

209. Minghini, A., L. D. Britt, and M. A. Hill. 1998. Interleukin-1 and interleukin-6 mediated skeletal muscle arteriolar vasodilation: in vitro versus in vivo studies. *Shock* 9:210-215.

210. Tan, B. B., R. L. Prewitt, and L. D. Britt. 2001. Interleukin-10 prevents loss of tone of rat skeletal muscle arterioles exposed to endotoxin. *J.Surg.Res.* 100:110-115.

211. Wagner, E. M. 2000. TNF-alpha induced bronchial vasoconstriction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H946-H951.

212. Corder, R., M. Carrier, N. Khan, P. Klemm, and J. R. Vane. 1995. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26 Suppl 3:S56-S58.

213. Macarthur, H., D. M. Couri, G. H. Wilken, T. C. Westfall, A. J. Lechner, G. M. Matuschak, Z. Chen, and D. Salvemini. 2003. Modulation of serum cytokine levels by a novel superoxide dismutase mimetic, M40401, in an Escherichia coli model of septic shock: correlation with preserved circulating catecholamines. *Crit Care Med.* 31:237-245.

214. Bauer, P. R. 2002. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology.* 8:141-148.

215. Aird, W. C. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765-3777.

216. Cariou, A., J. D. Chiche, J. Charpentier, J. F. Dhainaut, and J. P. Mira. 2002. The era of genomics: impact on sepsis clinical trial design. *Crit Care Med.* 30:S341-S348.

217. Kumar, A., J. Short, and J. E. Parrillo. 1999. Genetic factors in septic shock. *JAMA* 282:579-581.

218. Nadel, S. 2002. Helping to understand studies examining genetic susceptibility to sepsis. *Clin.Exp.Immunol.* 127:191-192.

219. Yamamoto, K., T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito. 2002. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am.J.Pathol.* 161:1805-1814.

220. Reidy, M. A. and S. M. Schwartz. 1983. Endothelial injury and regeneration. IV. Endotoxin: a nondenuding injury to aortic endothelium. *Lab Invest* 48:25-34.

221. Leclerc, J., Q. Pu, D. Corseaux, E. Haddad, C. Decoene, R. Bordet, I. Six, B. Jude, and B. Vallet. 2000. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med.* 28:3672-3678.

222. Lee, M. M., G. B. Schuessler, and S. Chien. 1988. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. *Artery* 15:71-89.

223. Mutunga, M., B. Fulton, R. Bullock, A. Batchelor, A. Gascoigne, J. I. Gillespie, and S. V. Baudouin. 2001. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:195-200.

224. Ferro, T. J., N. Gertzberg, L. Selden, P. Neumann, and A. Johnson. 1997. Endothelial barrier dysfunction and p42 oxidation induced by TNF-alpha are mediated by nitric oxide. *Am.J.Physiol* 272:L979-L988.

225. Ferro, T., P. Neumann, N. Gertzberg, R. Clements, and A. Johnson. 2000. Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 278:L1107-L1117.

226. Tiruppathi, C., T. Naqvi, R. Sandoval, D. Mehta, and A. B. Malik. 2001. Synergistic effects of tumor necrosis factor-alpha and thrombin in increasing endothelial permeability. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281:L958-L968.

227. Brett, J., H. Gerlach, P. Nawroth, S. Steinberg, G. Godman, and D. Stern. 1989. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J.Exp.Med.* 169:1977-1991.

228. Mantovani, A., F. Bussolino, and M. Introna. 1997. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol.Today* 18:231-240.

229. Menger, M. D., M. Rucker, and B. Vollmar. 1997. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 8:2-7.

230. Aird, W. C. 2001. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 29:S28-S34.

231. Levi, M., T. T. Keller, E. van Gorp, and H. ten Cate. 2003. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc.Res.* 60:26-39.

232. Hooper, W. C. 2004. The relationship between inflammation and the anticoagulant pathway: the emerging role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). *Curr.Pharm.Des* 10:923-927.

233. Weiler, H., V. Lindner, B. Kerlin, B. H. Isermann, S. B. Hendrickson, B. C. Cooley, D. A. Meh, M. W. Mosesson, N. W. Shworak, M. J. Post, E. M. Conway, L. H. Ulfman, U. H. von Andrian, and J. I. Weitz. 2001. Characterization of a mouse model for thrombomodulin deficiency. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1531-1537.

234. Faust, S. N., M. Levin, O. B. Harrison, R. D. Goldin, M. S. Lockhart, S. Kondaveeti, Z. Laszik, C. T. Esmon, and R. S. Heyderman. 2001. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N.Engl.J.Med.* 345:408-416.

235. Hermans, P. W., M. L. Hibberd, R. Booy, O. Daramola, J. A. Hazelzet, R. de Groot, and M. Levin. 1999. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 354:556-560.

236. Mavrommatis, A. C., T. Theodoridis, M. Economou, A. Kotanidou, M. El Ali, V. Christopoulou-Kokkinou, and S. G. Zakynthinos. 2001. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 27:1853-1859.

237. Polunovsky, V. A., C. H. Wendt, D. H. Ingbar, M. S. Peterson, and P. B. Bitterman. 1994. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp.Cell Res.* 214:584-594.

238. Messmer, U. K., V. A. Briner, and J. Pfeilschifter. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 55:2322-2337.

239. Stefanec, T. 2000. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 117:841-854.

240. Bombeli, T., A. Karsan, J. F. Tait, and J. M. Harlan. 1997. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 89:2429-2442.

241. Bombeli, T., B. R. Schwartz, and J. M. Harlan. 1999. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 93:3831-3838.

242. Bannerman, D. D., M. Sathyamoorthy, and S. E. Goldblum. 1998. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J.Biol.Chem.* 273:35371-35380.

243. Pohlman, T. H. and J. M. Harlan. 1989. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol.* 119:41-52.

244. Frey, E. A. and B. B. Finlay. 1998. Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. *Microb.Pathog.* 24:101-109.

245. Hu, X., E. Yee, J. M. Harlan, F. Wong, and A. Karsan. 1998. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood* 92:2759-2765.

246. Hoyt, D. G., R. J. Mannix, J. M. Rusnak, B. R. Pitt, and J. S. Lazo. 1995. Collagen is a survival factor against LPS-induced apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol* 269:L171-L177.

247. Hoyt, D. G., R. J. Mannix, M. E. Gerritsen, S. C. Watkins, J. S. Lazo, and B. R. Pitt. 1996. Integrins inhibit LPS-induced DNA strand breakage in cultured lung endothelial cells. *Am.J.Physiol* 270:L689-L694.

248. Bannerman, D. D., J. C. Tupper, W. A. Ricketts, C. F. Bennett, R. K. Winn, and J. M. Harlan. 2001. A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 276:14924-14932.

249. Choi, K. B., F. Wong, J. M. Harlan, P. M. Chaudhary, L. Hood, and A. Karsan. 1998. Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 273:20185-20188.

250. Cryer, H. M., R. N. Garrison, and P. D. Harris. 1988. Role of muscle microvasculature during hyperdynamic and hypodynamic phases of endotoxin shock in decerebrate rats. *J.Trauma* 28:312-318.

251. Cryer, H. M., R. N. Garrison, H. W. Kaebnick, P. D. Harris, and L. M. Flint. 1987. Skeletal microcirculatory responses to hyperdynamic Escherichia coli sepsis in unanesthetized rats. *Arch.Surg.* 122:86-92.

252. Neviere, R., D. Mathieu, J. L. Chagnon, N. Lebleu, J. P. Millien, and F. Wattel. 1996. Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:191-195.

253. Nelson, D. P., R. W. Samsel, L. D. Wood, and P. T. Schumacker. 1988. Pathological supply dependence of systemic and intestinal O2 uptake during endotoxemia. *J.Appl.Physiol* 64:2410-2419.

254. Lam, C., K. Tyml, C. Martin, and W. Sibbald. 1994. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J.Clin.Invest* 94:2077-2083.

255. Lubbe, A. S., R. N. Garrison, H. M. Cryer, N. L. Alsip, and P. D. Harris. 1992. EDRF as a possible mediator of sepsis-induced arteriolar dilation in skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 262:H880-H887.

256. Hollenberg, S. M., C. R. Easington, J. Osman, M. Broussard, and J. E. Parrillo. 1999. Effects of nitric oxide synthase inhibition on microvascular reactivity in septic mice. *Shock* 12:262-267.

257. Hollenberg, S. M., M. Broussard, J. Osman, and J. E. Parrillo. 2000. Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ.Res.* 86:774-778.

258. Sutton, E. T., J. G. Norman, C. A. Newton, G. R. Hellermann, and I. S. Richards. 1997. Endothelial structural integrity is maintained during endotoxic shock in an interleukin-1 type 1 receptor knockout mouse. *Shock* 7:105-110.

259. Ellis, C. G., R. M. Bateman, M. D. Sharpe, W. J. Sibbald, and R. Gill. 2002. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O(2) extraction in sepsis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 282:H156-H164.

260. Goldman, D., R. M. Bateman, and C. G. Ellis. 2004. Effect of sepsis on skeletal muscle oxygen consumption and tissue oxygenation: interpreting capillary oxygen transport data using a mathematical model. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 287:H2535-H2544.

261. Lam, C., K. Tyml, C. Martin, and W. Sibbald. 1994. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J.Clin.Invest* 94:2077-2083.

262. McCormack, D. G., S. Mehta, K. Tyml, J. A. Scott, R. Potter, and M. Rohan. 2000. Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvasc.Res.* 60:131-140.

263. Farquhar, I., C. M. Martin, C. Lam, R. Potter, C. G. Ellis, and W. J. Sibbald. 1996. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J.Surg.Res.* 61:190-196.

264. Piagnerelli, M., K. Z. Boudjeltia, M. Vanhaeverbeek, and J. L. Vincent. 2003. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med.* 29:1052-1061.

265. Todd, J. C., III, N. D. Poulos, L. W. Davidson, and D. L. Mollitt. 1993. Role of the leukocyte in endotoxin-induced alterations of the red cell membrane. Second place winner of the Conrad Jobst Award in the Gold Medal paper competition. *Am.Surg.* 59:9-12.

266. Todd, J. C., III and D. L. Mollitt. 1994. Sepsis-induced alterations in the erythrocyte membrane. *Am.Surg.* 60:954-957.

267. Jia, L., C. Bonaventura, J. Bonaventura, and J. S. Stamler. 1996. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226.

268. Ismail, N. H., E. J. Cohn, Jr., and D. L. Mollitt. 1997. Nitric oxide synthase inhibition negates septic-induced alterations in cytoplasmic calcium homeostasis and membrane dynamics. *Am.Surg.* 63:20-23.

269. Mallozzi, C., A. M. Di Stasi, and M. Minetti. 1997. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J.* 11:1281-1290.

270. Todd, J. C., III and D. L. Mollitt. 1995. Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. *Crit Care Med.* 23:459-465.

271. Todd, J. C., III and D. L. Mollitt. 1995. Leukocyte modulation inhibits endotoxin-induced disruption of intracellular calcium homeostasis. *J.Trauma* 39:1148-1151.

272. Todd, J. C., III and D. L. Mollitt. 1995. Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. *Crit Care Med.* 23:459-465.

273. Piagnerelli, M., K. Z. Boudjeltia, D. Brohee, P. Piro, E. Carlier, J. L. Vincent, P. Lejeune, and M. Vanhaeverbeek. 2003. Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med.* 31:2156-2162.

274. Claster, S., D. T. Chiu, A. Quintanilha, and B. Lubin. 1984. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood* 64:1079-1084.

275. Hartl, W. H., B. Gunther, D. Inthorn, and G. Heberer. 1988. Reactive hyperemia in patients with septic conditions. *Surgery* 103:440-444.

276. Young, J. D. and E. M. Cameron. 1995. Dynamics of skin blood flow in human sepsis. *Intensive Care Med.* 21:669-674.

277. Kubli, S., Y. Boegli, A. D. Ave, L. Liaudet, J. P. Revelly, S. Golay, A. Broccard, B. Waeber, M. D. Schaller, and F. Feihl. 2003. Endothelium-dependent vasodilation in the skin microcirculation of patients with septic shock. *Shock* 19:274-280.

278. Neviere, R., D. Mathieu, J. L. Chagnon, N. Lebleu, J. P. Millien, and F. Wattel. 1996. Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:191-195.

279. De Backer, D., J. Creteur, J. C. Preiser, M. J. Dubois, and J. L. Vincent. 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:98-104.

280. Spronk, P. E., C. Ince, M. J. Gardien, K. R. Mathura, H. M. Oudemans-van Straaten, and D. F. Zandstra. 2002. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 360:1395-1396.

281. Sakr, Y., M. J. Dubois, D. De Backer, J. Creteur, and J. L. Vincent. 2004. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 32:1825-1831.

282. De Backer, D., J. Creteur, M. J. Dubois, Y. Sakr, M. Koch, C. Verdant, and J. L. Vincent. 2006. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Crit Care Med.* 34:403-408.

283. De Backer, D., C. Verdant, M. Chierego, M. Koch, A. Gullo, and J. L. Vincent. 2006. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 34:1918-1924.

284. Trzeciak, S., R. P. Dellinger, J. E. Parrillo, M. Guglielmi, J. Bajaj, N. L. Abate, R. C. Arnold, S. Colilla, S. Zanotti, and S. M. Hollenberg. 2007. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann.Emerg.Med.* 49:88-98, 98.

285. Boerma, E. C., P. H. van der Voort, P. E. Spronk, and C. Ince. 2007. Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Crit Care Med.* 35:1055-1060.

286. Ince, C., J. F. Ashruf, J. A. Avontuur, P. A. Wieringa, J. A. Spaan, and H. A. Bruining. 1993. Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level. *Am.J.Physiol* 264:H294-H301.

287. Avontuur, J. A., H. A. Bruining, and C. Ince. 1995. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ.Res.* 76:418-425.

288. Vetterlein, F., M. Prange, D. Lubrich, J. Pedina, M. Neckel, and G. Schmidt. 1995. Capillary perfusion pattern and microvascular geometry in heterogeneous hypoxic areas of hypoperfused rat myocardium. *Am.J.Physiol* 268:H2183-H2194.

289. Avontuur, J. A., H. A. Bruining, and C. Ince. 1995. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ.Res.* 76:418-425.

290. Ince, C. and M. Sinaasappel. 1999. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med.* 27:1369-1377.

291. Shepherd, A. P. and J. W. Kiel. 1992. A model of countercurrent shunting of oxygen in the intestinal villus. *Am.J.Physiol* 262:H1136-H1142.

292. van Lambalgen, A. A., A. A. van Kraats, G. C. van den Bos, H. V. Stel, J. Straub, A. J. Donker, and L. G. Thijs. 1991. Renal function and metabolism during endotoxemia in rats: role of hypoperfusion. *Circ.Shock* 35:164-173.

293. Toth, A., M. Pal, M. E. Tischler, and P. C. Johnson. 1996. Are there oxygen-deficient regions in resting skeletal muscle? *Am.J.Physiol* 270:H1933-H1939.

294. Vallet, B., N. Lund, S. E. Curtis, D. Kelly, and S. M. Cain. 1994. Gut and muscle tissue PO2 in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J.Appl.Physiol* 76:793-800.

295. Boekstegers, P., S. Weidenhofer, T. Kapsner, and K. Werdan. 1994. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 22:640-650.

296. Gutierrez, G., R. J. Pohil, and P. Narayana. 1989. Skeletal muscle O2 consumption and energy metabolism during hypoxemia. *J.Appl.Physiol* 66:2117-2123.

297. Sinaasappel, M., M. van Iterson, and C. Ince. 1999. Microvascular oxygen pressure in the pig intestine during haemorrhagic shock and resuscitation. *J.Physiol* 514 (Pt 1):245-253.

298. Cicutti, N., K. Rakusan, and H. F. Downey. 1994. Coronary artery occlusion extends perfusion territory boundaries through microvascular collaterals. *Basic Res.Cardiol.* 89:427-437.

299. Menger, M. D. and B. Vollmar. 1996. In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 13:125-129.

300. Cronenwett, J. L. and S. M. Lindenauer. 1979. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow in the septic canine hindlimb. *Surgery* 85:275-282.

301. Stein, J. C., C. G. Ellis, and M. L. Ellsworth. 1993. Relationship between capillary and systemic venous PO2 during nonhypoxic and hypoxic ventilation. *Am.J.Physiol* 265:H537-H542.

302. Roth, A. C. and E. O. Feigl. 1981. Diffusional shunting in the canine myocardium. *Circ.Res.* 48:470-480.

303. Shepherd, A. P. and J. W. Kiel. 1992. A model of countercurrent shunting of oxygen in the intestinal villus. *Am.J.Physiol* 262:H1136-H1142.

304. Gutierrez, G. 1986. The rate of oxygen release and its effect on capillary O2 tension: a mathematical analysis. *Respir.Physiol* 63:79-96.

305. Spronk, P. E., C. Ince, M. J. Gardien, K. R. Mathura, H. M. Oudemans-van Straaten, and D. F. Zandstra. 2002. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 360:1395-1396.

306. Ince, C. 2005. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* 9 Suppl 4:S13-S19.

307. Fink, M. 1997. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl* 110:87-95.

308. Fink, M. P. 2002. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care* 6:491-499.

309. Astiz, M., E. C. Rackow, M. H. Weil, and W. Schumer. 1988. Early impairment of oxidative metabolism and energy production in severe sepsis. *Circ.Shock* 26:311-320.

310. Hotchkiss, R. S., R. S. Rust, C. S. Dence, T. H. Wasserman, S. K. Song, D. R. Hwang, I. E. Karl, and M. J. Welch. 1991. Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [18F]fluoromisonidazole. *Am.J.Physiol* 261:R965-R972.

311. VanderMeer, T. J., H. Wang, and M. P. Fink. 1995. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med.* 23:1217-1226.

312. Rosser, D. M., R. P. Stidwill, D. Jacobson, and M. Singer. 1995. Oxygen tension in the bladder epithelium rises in both high and low cardiac output endotoxemic sepsis. *J.Appl.Physiol* 79:1878-1882.

313. Simonson, S. G., K. Welty-Wolf, Y. T. Huang, J. A. Griebel, M. S. Caplan, P. J. Fracica, and C. A. Piantadosi. 1994. Altered mitochondrial redox responses in gram negative septic shock in primates. *Circ.Shock* 43:34-43.

314. Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, and M. Tomlanovich. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N.Engl.J.Med.* 345:1368-1377.

315. Tuchschmidt, J., J. Fried, M. Astiz, and E. Rackow. 1992. Elevation of cardiac output and oxygen delivery improves outcome in septic shock. *Chest* 102:216-220.

316. Gattinoni, L., L. Brazzi, P. Pelosi, R. Latini, G. Tognoni, A. Pesenti, and R. Fumagalli. 1995. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO2 Collaborative Group. *N.Engl.J.Med.* 333:1025-1032.

317. Hayes, M. A., A. C. Timmins, E. H. Yau, M. Palazzo, C. J. Hinds, and D. Watson. 1994. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N.Engl.J.Med.* 330:1717-1722.

318. Boekstegers, P., S. Weidenhofer, T. Kapsner, and K. Werdan. 1994. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 22:640-650.

319. Sair, M., P. J. Etherington, W. C. Peter, and T. W. Evans. 2001. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit Care Med.* 29:1343-1349.

320. Vary, T. C., J. H. Siegel, T. Nakatani, T. Sato, and H. Aoyama. 1986. Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am.J.Physiol* 250:E634-E640.

321. Vary, T. C. 1991. Increased pyruvate dehydrogenase kinase activity in response to sepsis. *Am.J.Physiol* 260:E669-E674.

322. Vary, T. C. 1996. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. *Shock* 6:89-94.

323. Vary, T. C. and S. Hazen. 1999. Sepsis alters pyruvate dehydrogenase kinase activity in skeletal muscle. *Mol.Cell Biochem.* 198:113-118.

324. Borutaite, V. and G. C. Brown. 1996. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem.J.* 315 (Pt 1):295-299.

325. Cassina, A. and R. Radi. 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch.Biochem.Biophys.* 328:309-316.

326. Nishikawa, M., E. F. Sato, T. Kuroki, and M. Inoue. 1997. Role of glutathione and nitric oxide in the energy metabolism of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 415:341-345.

327. Takehara, Y., H. Nakahara, S. Okada, K. Yamaoka, K. Hamazaki, A. Yamazato, M. Inoue, and K. Utsumi. 1999. Oxygen concentration regulates NO-dependent relaxation of aortic smooth muscles. *Free Radic.Res.* 30:287-294.

328. Torres, J., V. Darley-Usmar, and M. T. Wilson. 1995. Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem.J.* 312 (Pt 1):169-173.

329. Giuffre, A., P. Sarti, E. D'Itri, G. Buse, T. Soulimane, and M. Brunori. 1996. On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 271:33404-33408.

330. Ghafourifar, P., U. Schenk, S. D. Klein, and C. Richter. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J.Biol.Chem.* 274:31185-31188.

331. Ghafourifar, P. 2002. Characterization of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol.* 359:339-350.

332. Ghafourifar, P., M. L. Asbury, S. S. Joshi, and E. D. Kincaid. 2005. Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Methods Enzymol.* 396:424-444.

333. Ghafourifar, P. and E. Cadenas. 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol.Sci.* 26:190-195.

334. Kanai, A. J., L. L. Pearce, P. R. Clemens, L. A. Birder, M. M. VanBibber, S. Y. Choi, W. C. de Groat, and J. Peterson. 2001. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:14126-14131.

335. Radi, R., M. Rodriguez, L. Castro, and R. Telleri. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* 308:89-95.

336. Radi, R., M. Rodriguez, L. Castro, and R. Telleri. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* 308:89-95.

337. Radi, R., M. Rodriguez, L. Castro, and R. Telleri. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* 308:89-95.

338. Tortora, V., C. Quijano, B. Freeman, R. Radi, and L. Castro. 2007. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic.Biol.Med.* 42:1075-1088.

339. Castro, L., M. Rodriguez, and R. Radi. 1994. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 269:29409-29415.

340. Satoh, M. S., G. G. Poirier, and T. Lindahl. 1994. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry* 33:7099-7106.

341. Satoh, M. S., G. G. Poirier, and T. Lindahl. 1994. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry* 33:7099-7106.

342. Simbulan-Rosenthal, C. M., D. S. Rosenthal, S. Iyer, H. Boulares, and M. E. Smulson. 1999. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol.Cell Biochem.* 193:137-148.

343. Szabo, C., B. Zingarelli, M. O'Connor, and A. L. Salzman. 1996. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:1753-1758.

344. Szabo, C. and A. L. Salzman. 1995. Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immuno-stimulated J774.2 macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 209:739-743.

345. Zingarelli, B., M. O'Connor, H. Wong, A. L. Salzman, and C. Szabo. 1996. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 156:350-358.

346. Khan, A. U., R. L. Delude, Y. Y. Han, P. L. Sappington, X. Han, J. A. Carcillo, and M. P. Fink. 2002. Liposomal NAD(+) prevents diminished O(2) consumption by immunostimulated Caco-2 cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282:L1082-L1091.

347. Pulido, E. J., B. D. Shames, C. H. Selzman, H. A. Barton, A. Banerjee, D. D. Bensard, and R. C. McIntyre, Jr. 1999. Inhibition of PARS attenuates endotoxin-induced dysfunction of pulmonary vasorelaxation. *Am.J.Physiol* 277:L769-L776.

348. Szabo, A., A. L. Salzman, and C. Szabo. 1998. Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates pulmonary microvascular and intestinal mucosal dysfunction in endotoxin shock. *Life Sci.* 63:2133-2139.

349. Goldfarb, R. D., D. Glock, A. Kumar, R. J. McCarthy, J. Mei, T. Guynn, M. Matushek, G. Trenholme, and J. E. Parrillo. 1996. A porcine model of peritonitis and bacteremia simulates human septic shock. *Shock* 6:442-451.

350. Kuhnle, S., P. Nicotera, A. Wendel, and M. Leist. 1999. Prevention of endotoxin-induced lethality, but not of liver apoptosis in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 263:433-438.

351. Oliver, F. J., J. Menissier-de Murcia, C. Nacci, P. Decker, R. Andriantsitohaina, S. Muller, R. G. de la, J. C. Stoclet, and G. de Murcia. 1999. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 18:4446-4454.

352. Boulos, M., M. E. Astiz, R. S. Barua, and M. Osman. 2003. Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) synthase. *Crit Care Med.* 31:353-358.

353. Singer, M., S. De, V, D. Vitale, and W. Jeffcoate. 2004. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 364:545-548.

354. Noble, J. S., F. N. MacKirdy, S. I. Donaldson, and J. C. Howie. 2001. Renal and respiratory failure in Scottish ICUs. *Anaesthesia* 56:124-129.

355. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, B. D. Freeman, K. W. Tinsley, J. P. Cobb, G. M. Matuschak, T. G. Buchman, and I. E. Karl. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 27:1230-1251.

356. Kreymann, G., S. Grosser, P. Buggisch, C. Gottschall, S. Matthaei, and H. Greten. 1993. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med.* 21:1012-1019.

357. Boekstegers, P., S. Weidenhofer, G. Pilz, and K. Werdan. 1991. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection* 19:317-323.

358. De Backer, D., J. Creteur, J. C. Preiser, M. J. Dubois, and J. L. Vincent. 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:98-104.

359. Tsai, A. G., P. Cabrales, R. M. Winslow, and M. Intaglietta. 2003. Microvascular oxygen distribution in awake hamster window chamber model during hyperoxia. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285:H1537-H1545.

360. Van den Berghe, G. H. 1998. Acute and prolonged critical illness are two distinct neuroendocrine paradigms. *Verh.K.Acad.Geneeskd.Belg.* 60:487-518.

361. Sugita, H., M. Kaneki, E. Tokunaga, M. Sugita, C. Koike, S. Yasuhara, R. G. Tompkins, and J. A. Martyn. 2002. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 282:E386-E394.

362. Agwunobi, A. O., C. Reid, P. Maycock, R. A. Little, and G. L. Carlson. 2000. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85:3770-3778.

363. Ligtenberg, J. J., A. R. Girbes, J. A. Beentjes, J. E. Tulleken, T. S. van der Werf, and J. G. Zijlstra. 2001. Hormones in the critically ill patient: to intervene or not to intervene? *Intensive Care Med.* 27:1567-1577.

364. Rothwell, P. M. and P. G. Lawler. 1995. Prediction of outcome in intensive care patients using endocrine parameters. *Crit Care Med.* 23:78-83.

365. Annane, D., V. Sebille, G. Troche, J. C. Raphael, P. Gajdos, and E. Bellissant. 2000. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA* 283:1038-1045.

366. Scheller, K., P. Seibel, and C. E. Sekeris. 2003. Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int.Rev.Cytol.* 222:1-61.

367. Venditti, P., A. Puca, and S. Di Meo. 2003. Effect of thyroid state on rate and sites of H2O2 production in rat skeletal muscle mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 411:121-128.

368. Short, K. R., J. Nygren, R. Barazzoni, J. Levine, and K. S. Nair. 2001. T(3) increases mitochondrial ATP production in oxidative muscle despite increased expression of UCP2 and -3. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 280:E761-E769.

369. Nogueira, V., L. Walter, N. Averet, E. Fontaine, M. Rigoulet, and X. M. Leverve. 2002. Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *J.Bioenerg.Biomembr.* 34:55-66.

370. Palazzo, M. G. and P. M. Suter. 1991. Delivery dependent oxygen consumption in patients with septic shock: daily variations, relationship with outcome and the sick-euthyroid syndrome. *Intensive Care Med.* 17:325-332.

371. Duclos, M., C. Martin, M. Malgat, J. P. Mazat, F. Chaouloff, P. Mormede, and T. Letellier. 2001. Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Pflugers Arch.* 443:218-226.

372. Brealey, D., S. Karyampudi, T. S. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R. T. Smolenski, and M. Singer. 2004. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286:R491-R497.

373. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223.

374. Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.

375. Crouser, E. D., M. W. Julian, J. E. Huff, D. V. Mandich, and K. B. Green-Church. 2006. A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med.* 32:1252-1262.

376. Protti, A. and M. Singer. 2006. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit Care* 10:228.

377. Frost, M. T., Q. Wang, S. Moncada, and M. Singer. 2005. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 288:R394-R400.

378. Weitzel, J. M., K. A. Iwen, and H. J. Seitz. 2003. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp.Physiol* 88:121-128.

379. Duckles, S. P., D. N. Krause, C. Stirone, and V. Procaccio. 2006. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol.Interv.* 6:26-35.

380. Stirone, C., S. P. Duckles, D. N. Krause, and V. Procaccio. 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol.Pharmacol.* 68:959-965.

381. Stump, C. S., K. R. Short, M. L. Bigelow, J. M. Schimke, and K. S. Nair. 2003. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:7996-8001.

382. Scheller, K. and C. E. Sekeris. 2003. The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp.Physiol* 88:129-140.

383. Orci, L., W. S. Cook, M. Ravazzola, M. Y. Wang, B. H. Park, R. Montesano, and R. H. Unger. 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:2058-2063.

384. Leon-Sanz, M., J. A. Lorente, L. Larrodera, P. Ros, J. Alvarez, A. E. Esteban, and L. Landin. 1997. Pituitary-thyroid function in patients with septic shock and its relation with outcome. *Eur.J.Med.Res.* 2:477-482.

385. Dulchavsky, S. A., P. R. Kennedy, E. R. Geller, S. R. Maitra, W. M. Foster, and E. G. Langenbeck. 1991. T3 preserves respiratory function in sepsis. *J.Trauma* 31:753-758.

386. Van den, B. G., F. de Zegher, and R. Bouillon. 1998. Clinical review 95: Acute and prolonged critical illness as different neuroendocrine paradigms. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83:1827-1834.

387. Annane, D. and E. Bellissant. 2000. Prognostic value of cortisol response in septic shock. *JAMA* 284:308-309.

388. Annane, D., V. Sebille, G. Troche, J. C. Raphael, P. Gajdos, and E. Bellissant. 2000. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA* 283:1038-1045.

389. Bornstein, S. R., J. Licinio, R. Tauchnitz, L. Engelmann, A. B. Negrao, P. Gold, and G. P. Chrousos. 1998. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83:280-283.

390. Calvano, S. E., W. Xiao, D. R. Richards, R. M. Felciano, H. V. Baker, R. J. Cho, R. O. Chen, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L. L. Moldawer, M. N. Mindrinos, R. W. Davis, R. G. Tompkins, and S. F. Lowry. 2005. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437:1032-1037.

391. Delogu, G., G. Famularo, F. Amati, L. Signore, A. Antonucci, V. Trinchieri, L. Di Marzio, and M. G. Cifone. 1999. Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 27:2413-2417.

392. Arora, A. S., B. J. Jones, T. C. Patel, S. F. Bronk, and G. J. Gores. 1997. Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology* 25:958-963.

393. Siskind, L. J., R. N. Kolesnick, and M. Colombini. 2002. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J.Biol.Chem.* 277:26796-26803.

394. von Haefen, C., T. Wieder, B. Gillissen, L. Starck, V. Graupner, B. Dorken, and P. T. Daniel. 2002. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 21:4009-4019.

395. von Haefen, C., T. Wieder, B. Gillissen, L. Starck, V. Graupner, B. Dorken, and P. T. Daniel. 2002. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 21:4009-4019.

396. Crouser, E. D., M. W. Julian, J. E. Huff, M. S. Joshi, J. A. Bauer, M. E. Gadd, M. D. Wewers, and D. R. Pfeiffer. 2004. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med.* 32:478-488.

397. Murphy, K. M., U. N. Streips, and R. B. Lock. 1999. Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene* 18:5991-5999.

398. Coopersmith, C. M., P. E. Stromberg, W. M. Dunne, C. G. Davis, D. M. Amiot, T. G. Buchman, I. E. Karl, and R. S. Hotchkiss. 2002. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* 287:1716-1721.

399. Coopersmith, C. M., K. C. Chang, P. E. Swanson, K. W. Tinsley, P. E. Stromberg, T. G. Buchman, I. E. Karl, and R. S. Hotchkiss. 2002. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med.* 30:195-201.

400. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, B. D. Freeman, K. W. Tinsley, J. P. Cobb, G. M. Matuschak, T. G. Buchman, and I. E. Karl. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 27:1230-1251.

401. Holmuhamedov, E., A. Jahangir, M. Bienengraeber, L. D. Lewis, and A. Terzic. 2003. Deletion of mtDNA disrupts mitochondrial function and structure, but not biogenesis. *Mitochondrion.* 3:13-19.

402. Broekemeier, K. M., J. R. Iben, E. G. LeVan, E. D. Crouser, and D. R. Pfeiffer. 2002. Pore formation and uncoupling initiate a Ca2+-independent degradation of mitochondrial phospholipids. *Biochemistry* 41:7771-7780.

403. Garcia-Ruiz, C., A. Colell, M. Mari, A. Morales, and J. C. Fernandez-Checa. 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J.Biol.Chem.* 272:11369-11377.

404. Mather, M. and H. Rottenberg. 2000. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 273:603-608.

405. Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, T. Qian, L. C. Trost, S. P. Elmore, Y. Nishimura, R. A. Crowe, W. E. Cascio, C. A. Bradham, D. A. Brenner, and B. Herman. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim.Biophys.Acta* 1366:177-196.

406. Prins, J., E. Ledgerwood, P. Ameloot, P. Vandenabeele, P. Faraco, N. Bright, S. O'Rahilly, and J. Bradley. 1998. Tumour necrosis factor induced autophagy and mitochondrial morphological abnormalities are mediated by TNFR-I and/or TNFR-II and do not invariably lead to cell death. *Biochem.Soc.Trans.* 26:S314.

407. Tavakoli, H. and L. Mela. 1982. Alterations of mitochondrial metabolism and protein concentrations in subacute septicemia. *Infect.Immun.* 38:536-541.

408. Crouser, E. D. 2004. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 4:729-741.

409. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223.

410. Szabo, C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol.Lett.* 140-141:105-112.

411. Crouser, E. D., M. W. Julian, J. E. Huff, M. S. Joshi, J. A. Bauer, M. E. Gadd, M. D. Wewers, and D. R. Pfeiffer. 2004. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med.* 32:478-488.

412. Gellerich, F. N., S. Trumbeckaite, J. R. Opalka, J. F. Gellerich, Y. Chen, C. Neuhof, H. Redl, K. Werdan, and S. Zierz. 2002. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci.Rep.* 22:99-113.

413. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223.

414. Liaudet, L., F. G. Soriano, and C. Szabo. 2000. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 28:N37-N52.

415. Tsan, M. F., R. N. Clark, S. M. Goyert, and J. E. White. 2001. Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 280:C1422-C1430.

416. Rogers, R. J., J. M. Monnier, and H. S. Nick. 2001. Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. *J.Biol.Chem.* 276:20419-20427.

417. Nethery, D., L. A. Callahan, D. Stofan, R. Mattera, A. DiMarco, and G. Supinski. 2000. PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J.Appl.Physiol* 89:72-80.

418. Ritter, C., M. Andrades, M. L. Frota Junior, F. Bonatto, R. A. Pinho, M. Polydoro, F. Klamt, C. T. Pinheiro, S. S. Menna-Barreto, J. C. Moreira, and F. Dal Pizzol. 2003. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.* 29:1782-1789.

419. Liochev, S. I. and I. Fridovich. 1997. How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on "free" iron. *Free Radic.Biol.Med.* 23:668-671.

420. Cederbaum, A. I. 2003. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol* 30:115-120.

421. Crouser, E. D., M. W. Julian, J. E. Huff, D. V. Mandich, and K. B. Green-Church. 2006. A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med.* 32:1252-1262.

422. Salleh, M. and M. Ardawi. 1992. Hepatic glutamine metabolism in the septic rat. *Clin.Sci.(Lond)* 82:709-716.

423. Argaman, Z., V. R. Young, N. Noviski, L. Castillo-Rosas, X. M. Lu, D. Zurakowski, M. Cooper, C. Davison, J. F. Tharakan, A. Ajami, and L. Castillo. 2003. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. *Crit Care Med.* 31:591-597.

424. Bruins, M. J., W. H. Lamers, A. J. Meijer, P. B. Soeters, and N. E. Deutz. 2002. In vivo measurement of nitric oxide production in porcine gut, liver and muscle during hyperdynamic endotoxaemia. *Br.J.Pharmacol.* 137:1225-1236.

425. Galban, C., J. C. Montejo, A. Mesejo, P. Marco, S. Celaya, J. M. Sanchez-Segura, M. Farre, and D. J. Bryg. 2000. An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med.* 28:643-648.

426. Isobe, H., K. Okajima, N. Harada, W. Liu, and H. Okabe. 2004. Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury. *J.Thromb.Haemost.* 2:313-320.

427. Hoffmann, J. N., B. Vollmar, M. W. Laschke, D. Inthorn, J. Fertmann, F. W. Schildberg, and M. D. Menger. 2004. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med.* 32:1011-1017.

428. Cabrales, P., B. Y. Vazquez, A. G. Tsai, and M. Intaglietta. 2007. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J.Appl.Physiol* 102:2251-2259.

429. Kirschenbaum, L. A., W. C. Lopez, P. Ohrum, A. Tsen, J. Khazin, and M. E. Astiz. 2006. Effect of recombinant activated protein C and low-dose heparin on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Crit Care Med.* 34:2207-2212.

430. De Backer, D., C. Verdant, M. Chierego, M. Koch, A. Gullo, and J. L. Vincent. 2006. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 34:1918-1924.

431. Bhattacharya, A., B. W. Grinnell, and M. L. Cohen. 2000. Unlike thrombin, protein C and activated protein C do not affect vascular tone. *Peptides* 21:1231-1236.

432. Isobe, H., K. Okajima, M. Uchiba, A. Mizutani, N. Harada, A. Nagasaki, and K. Okabe. 2001. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 104:1171-1175.

433. Wiel, E., M. E. Costecalde, G. Lebuffe, D. Corseaux, B. Jude, R. Bordet, B. Tavernier, and B. Vallet. 2006. Activated protein C increases sensitivity to vasoconstriction in rabbit Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Crit Care* 10:R47.

434. Kalil, A. C., S. M. Coyle, J. Y. Um, S. P. LaRosa, M. A. Turlo, S. E. Calvano, D. P. Sundin, D. R. Nelson, and S. F. Lowry. 2004. Effects of drotrecogin alfa (activated) in human endotoxemia. *Shock* 21:222-229.

435. Derhaschnig, U., R. Reiter, P. Knobl, M. Baumgartner, P. Keen, and B. Jilma. 2003. Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood* 102:2093-2098.

436. Abraham, E. 2005. Effects of recombinant human activated protein C in human models of endotoxin administration. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:243-247.

437. O'Brien, J. M., Jr. and E. Abraham. 2004. Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. *Crit Care Med.* 32:S202-S208.

438. van Eijk, L. T., P. Pickkers, P. Smits, B. W. van den, M. P. Bouw, and J. G. van der Hoeven. 2005. Microvascular permeability during experimental human endotoxemia: an open intervention study. *Crit Care* 9:R157-R164.

439. Monnet, X., B. Lamia, N. Anguel, C. Richard, G. Bonmarchand, and J. L. Teboul. 2005. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 31:1573-1576.

440. Vincent, J. L., D. C. Angus, A. Artigas, A. Kalil, B. R. Basson, H. H. Jamal, G. Johnson, III, and G. R. Bernard. 2003. Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. *Crit Care Med.* 31:834-840.

441. Rosser, D. M., R. P. Stidwill, D. Jacobson, and M. Singer. 1996. Cardiorespiratory and tissue oxygen dose response to rat endotoxemia. *Am.J.Physiol* 271:H891-H895.

442. Welty-Wolf, K. E., S. G. Simonson, Y. C. Huang, P. J. Fracica, J. W. Patterson, and C. A. Piantadosi. 1996. Ultrastructural changes in skeletal muscle mitochondria in gram-negative sepsis. *Shock* 5:378-384.

443. Brealey, D., S. Karyampudi, T. S. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R. T. Smolenski, and M. Singer. 2004. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286:R491-R497.

444. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223.

445. Levy, R. J., C. Vijayasarathy, N. R. Raj, N. G. Avadhani, and C. S. Deutschman. 2004. Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. *Shock* 21:110-114.

446. Van den, B. G., P. Wouters, F. Weekers, C. Verwaest, F. Bruyninckx, M. Schetz, D. Vlasselaers, P. Ferdinande, P. Lauwers, and R. Bouillon. 2001. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N.Engl.J.Med.* 345:1359-1367.

447. Vanhorebeek, I., R. De Vos, D. Mesotten, P. J. Wouters, C. Wolf-Peeters, and B. G. Van den. 2005. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 365:53-59.

448. Kantrow, S. P., D. E. Taylor, M. S. Carraway, and C. A. Piantadosi. 1997. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch.Biochem.Biophys.* 345:278-288.