



**HAL**  
open science

# Impacts hémodynamique et inflammatoire de la modulation de la fréquence cardiaque dans le choc septique

Antoine Kimmoun

► **To cite this version:**

Antoine Kimmoun. Impacts hémodynamique et inflammatoire de la modulation de la fréquence cardiaque dans le choc septique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0178 . tel-01526688

**HAL Id: tel-01526688**

**<https://theses.hal.science/tel-01526688>**

Submitted on 23 May 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

Par **Antoine Kimmoun**

**Impacts hémodynamique et inflammatoire de la modulation de la fréquence  
cardiaque dans le choc septique**

Le 24 mai 2016

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	M <sup>me</sup> Fabienne Tamion,	PU-PH	U1096 : Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction endothéliale et de l'insuffisance cardiaque	Rouen
	M. Francis Schneider,	PU-PH	U977 Biomatériaux et ingénierie tissulaire	Strasbourg
<b>Examineurs :</b>	M. Ferhat Meziani,	PU-PH	EA7293 : Stress vasculaire et tissulaire en transplantation : microparticules et environnement	Strasbourg
	M. Djilalli Annane,	PU-PH	EA4342 : Laboratoire d'étude de la réponse neuroendocrine au sepsis	Garches
	M. Pierre Asfar,	PU-PH	UMR 6214, UMR_S U771 : Biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée	Angers
	M. Nguyen Tran,	MCU	Ecole de Chirurgie de Nancy	Nancy
	M. Bruno Levy, Directeur de Thèse	PU-PH	U1116 : Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique	Nancy

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>6</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Légendes</b> .....	<b>14</b>
<b>Tableaux</b> .....	<b>15</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>16</b>
<b>Doit-on redéfinir le choc septique ?</b> .....	<b>18</b>
<b>Epidémiologie du choc septique</b> .....	<b>21</b>
<b>L'infection, une complication fréquente de la réanimation</b> .....	<b>21</b>
<b>Incidence du choc septique en France</b> .....	<b>22</b>
<b>Typologie des malades à l'admission</b> .....	<b>24</b>
<b>Principales étiologies infectieuses</b> .....	<b>24</b>
<b>Quelles sont les complications associées au choc septique ?</b> .....	<b>25</b>
<b>Une mortalité en diminution.</b> .....	<b>26</b>
<b>Analyse de la mortalité dans les études multicentriques</b> .....	<b>27</b>
<b>Facteurs pronostiques dans le choc septique</b> .....	<b>28</b>
<b>Physiopathologie du choc septique</b> .....	<b>29</b>
<b>Initiation de la réponse inflammatoire par l'immunité innée : Réaction Hôte-Pathogène</b> .....	<b>29</b>
Toll like receptors, Pathogen-Associated Molecular Patterns et les Danger-Associated Molecular Patterns .....	29
Voie de signalisation des TLRs : l'exemple du lipopolysaccharide (LPS) et de TLR4 (figure 1) .....	30
<b>Immunité adaptative</b> .....	<b>31</b>
<b>De l'inflammation à la défaillance multi-viscérale</b> .....	<b>32</b>
Participation génétique .....	32
Participation des médiateurs de l'inflammation .....	33
Les cytokines .....	33
Le Monoxyde d'Azote .....	37
Espèce Réactive de l'Oxygène (ERO) et de l'Azote (ERA) .....	38
Eicosanoïdes .....	40
Dysfonction de la coagulation .....	42
Augmentation de l'expression du facteur tissulaire .....	43
Inhibition du système de la protéine C .....	44
Inhibition de la fibrinolyse .....	45
Dysfonction neuro-hormonale de l'axe corticotrope (annexe 1) .....	47
Dysfonction mitochondriale .....	47
Arguments cliniques pour une dysfonction mitochondriale durant le choc septique .....	47
Physiologie .....	47
Le stress oxydatif à l'origine de la dysfonction de la chaîne respiratoire durant le choc septique .....	49
Mécanismes endogènes protecteurs .....	51
Réalité clinique de la dysfonction mitochondriale septique .....	51
<b>Impact de l'acidose lactique dans la défaillance cardiovasculaire de l'état de choc.</b> .....	<b>52</b>
<b>Cœur et sepsis</b> .....	<b>52</b>
<b>Rappel sur la physiologie de la contraction et la relaxation myocardique</b> .....	<b>52</b>
Structures impliquées (Figure 8) .....	52
Couplage excitation – contraction .....	55
Transit calcique .....	55
Calcium induced – Calcium release (Figure 9) .....	56
Les ponts actine – myosine .....	57
Le phénomène de coopération .....	58

Relaxation (figure 10).....	58
<b>Physiopathologie de la dysfonction cardiaque durant le sepsis .....</b>	<b>59</b>
Historique.....	59
Caractérisation hémodynamique de la cardiomyopathie septique .....	60
Clinique .....	60
Fonction systolique ventriculaire gauche.....	60
Fonction diastolique ventriculaire gauche.....	61
Fonction ventriculaire droite .....	62
Marqueurs biologiques de la dysfonction cardiaque.....	63
La troponine.....	63
Le B Natriuretic Peptid.....	63
Mécanismes de niveau supra-cellulaire .....	64
Altération du débit sanguin coronaire .....	64
Atteinte microcirculatoire .....	65
Dysautonomie.....	65
Mécanismes de niveau cellulaire.....	66
Anomalies du transit calcique (figure 11) .....	66
Système adrénergique et $\beta$ 1-Adrénorécepteurs (figure 12) .....	68
Dysfonction mitochondriale .....	70
Signalisation inflammatoire.....	72
Apoptose.....	74
<b>Physiopathologie de la défaillance vasculaire.....</b>	<b>76</b>
<b>Modulation <math>\beta</math>-adrénergique durant le choc septique .....</b>	<b>77</b>
<b><math>\beta</math>-adrénorécepteurs et cascade de signalisation.....</b>	<b>77</b>
<b>Modulation de la réponse inflammatoire par le système adrénergique .....</b>	<b>81</b>
<b>Impact d'un traitement antagoniste des récepteurs <math>\beta</math>1 adrénergiques .....</b>	<b>85</b>
Pourquoi moduler le système $\beta$ adrénergique durant le choc septique ? .....	85
Etudes animales .....	88
Etudes humaines.....	94
<b>Problématique générale .....</b>	<b>100</b>
<b>Sujet de recherche numéro 1.....</b>	<b>101</b>
<b>Sujet de recherche numéro 2.....</b>	<b>101</b>
<b>Sujet de recherche numéro 3.....</b>	<b>101</b>
<b>Méthodologie générale des travaux expérimentaux 1 et 2.....</b>	<b>102</b>
<b>Modèle de choc septique expérimental.....</b>	<b>102</b>
Ethique (travail 1, 2) .....	102
Modèle de choc septique par ligature et ponction cœcale « CLP » (travail 1, 2, 3).....	102
<b>Evaluation de la fonction cardiaque <i>in vivo</i> .....</b>	<b>103</b>
Hémodynamique invasive basique (Travaux 1, 2).....	103
Cathétérisme de conductance (travail 1) .....	103
Quels sont les paramètres recueillis ? .....	104
Etude de l'inotropisme et de la lusitropie à partir des courbes P-V par la méthode de l'occlusion de la veine cave inférieure.....	105
Principes techniques.....	106
Micro-PET (travail 1) .....	107
Principes.....	107
Réalisation de l'examen cardiaque par micro-TEP .....	108
Reconstruction des images .....	109
Echocardiographie (Travail 2) .....	110
<b>Etude de survie (Travail 1).....</b>	<b>111</b>
<b>Evaluation de la vasoréactivité <i>ex vivo</i> (Travaux 1, 2) .....</b>	<b>111</b>
Principe technique.....	112
<b>Evaluation biologique .....</b>	<b>113</b>
Dosage ELISA (Travaux 1 et 2).....	113
Méthode de Polymérase Chain Reaction quantitative (Travail 1).....	114
Western Blotting (Travaux 1 et 2).....	115
<b>Points limites .....</b>	<b>117</b>

<b>Travail 1 : L'inhibition <math>\beta_1</math> – adrénergique améliore les fonctions cardiaques et vasculaires dans le choc septique expérimental</b> .....	<b>119</b>
<b>Hypothèses principales</b> .....	<b>119</b>
<b>Objectifs</b> .....	<b>119</b>
<b>Plan expérimental spécifique du travail</b> .....	<b>119</b>
<b>Analyse statistique</b> .....	<b>120</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>121</b>
Caractérisation du modèle (tableau 1).....	121
Effets hémodynamiques de l'adjonction d'esmolol (tableau 2).....	123
Effets du blocage $\beta_1$ adrénergique sur la survie (figure 3) .....	125
Effets de l'Esmolol sur les médiateurs systémiques de l'inflammation (figure 4) .....	125
Modulation de l'inflammation sur le tissu myocardique et vasculaire aortique.....	126
Modulation adrénergique suivant l'administration d'esmolol (figure 7).....	129
<b>Travail 2 : L'inhibition du canal if par l'ivabradine n'est pas associée à l'amélioration des fonctions cardiaque et vasculaire dans le choc septique expérimental. Annexe 6</b> .....	<b>130</b>
<b>Hypothèses principales</b> .....	<b>130</b>
<b>Objectifs</b> .....	<b>130</b>
<b>Plan expérimental spécifique du travail</b> .....	<b>130</b>
<b>Statistiques</b> .....	<b>131</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>132</b>
Détermination de la dose d'ivabradine nécessaire pour réduire la fréquence cardiaque de 20% chez le rat en choc septique par CLP .....	132
Caractérisation du modèle (tableau 1).....	133
Effets hémodynamiques de l'adjonction d'ivabradine.....	135
Effets inflammatoires systémiques de l'adjonction d'esmolol (figure 4) .....	136
Effets inflammatoires de l'ivabradine sur les tissus cardiaque et vasculaire (figures 5 et 6) .....	138
<b>Travail 3 : Effets anti-inflammatoire et cardioprotecteur de l'esmolol dans le choc septique. Etude ESMOSEPSIS. Annexe 7</b> .....	<b>140</b>
<b>Contexte</b> .....	<b>140</b>
<b>Hypothèse principale</b> .....	<b>140</b>
<b>Méthodologie</b> .....	<b>140</b>
<b>Etat d'avancement du travail</b> .....	<b>141</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>142</b>
Résultats principaux.....	142
Intérêt du modèle .....	142
Effets hémodynamiques du blocage $\beta_1$ adrénergique.....	143
Le blocage $\beta_1$ adrénergique joue un rôle essentiel dans la modulation de l'inflammation durant le choc septique .....	144
La réduction isolée de la fréquence cardiaque par ivabradine n'impacte pas sur le profil hémodynamique et inflammatoire.....	146
Limites .....	147
<b>Conclusion</b> .....	<b>151</b>
<b>Perspectives</b> .....	<b>151</b>
Travail 4 : .....	152
Méthodologie.....	152
Etat d'avancement de ce travail .....	153
Travail 5 : .....	153
Etat d'avancement de ce travail .....	154
<b>Références</b> .....	<b>155</b>
<b>Annexe 1 : Corticoïdes et choc septique</b> .....	<b>198</b>
<b>Annexe 2 : Cardiac Contractile Reserve Parameters Are Related to Prognosis in Septic Shock</b> .....	<b>199</b>

<b>Annexe 3 : Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside .....</b>	<b>200</b>
<b>Annexe 4 : Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock.....</b>	<b>201</b>
<b>Annexe 5 : <math>\beta</math>1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock .....</b>	<b>202</b>
<b>Annexe 6 : <i>If</i> Channel Inhibition with Ivabradine does not Improve Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock .....</b>	<b>203</b>
<b>Annexe 7 : Protocole Esmosepsis. ....</b>	<b>204</b>

## Remerciements

Au Pr Fabienne Tamion, Professeur de Réanimation, Rapporteur

*Nous vous remercions pour la somme de travail qu'a représenté le rapport de cette Thèse. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Pr Francis Schneider, Professeur de Réanimation, Examineur

*Nous vous remercions pour la somme de travail qu'a représenté le rapport de cette Thèse. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Pr Ferhat Meziani, Professeur de Réanimation, Examineur

*Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Pr Djilali Annane, Professeur de Réanimation, Examineur

*Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Pr Pierre Asfar, Professeur de Réanimation, Examineur

*Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Dr Nguyen Tran, Maître de Conférence en Physiologie, Examineur

*Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

Au Pr Bruno Levy, Professeur de Réanimation, Directeur de Thèse

*Vous nous avez fait l'honneur de nous accorder votre confiance depuis presque 10 ans. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre profonde gratitude.*



A tous ceux qui m'ont aidé et/ou supporté sur ces quatre années : Je vous remercie du fond du cœur :

Par ordre alphabétique pour ne pas faire de jaloux :

- Narimane Al Kattani	- D <sup>r</sup> Laura Muller
- Pr Djilali Annane	- D <sup>r</sup> Joseph Paquet
- D <sup>r</sup> Tomas Auchet	- D <sup>r</sup> Pierre Pérez
- Pr Marc Braun	- D <sup>r</sup> Aurore Perrot
- D <sup>r</sup> Elisabeth Baux	- Jacqueline Régnier
- Céline Bridey	- D <sup>r</sup> Marie-Alix Régnier
- D <sup>r</sup> Julie Delemazure	- Philippe Régnier
- D <sup>r</sup> Nicolas Dessalles	- D <sup>r</sup> Carine Thivilier
- D <sup>r</sup> Nicolas Ducrocq	- D <sup>r</sup> Chaoije Wei
- D <sup>r</sup> Caroline Fritz	- D <sup>r</sup> Stéphane Zuily
- D <sup>r</sup> Nicolas Girerd	
- D <sup>r</sup> Sandrine Henard	et....
- Julie Kimmoun	
- Alice Kimmoun	Tous les IDEs/AS/ASH/secrétaires de la
- Olivier Kimmoun	Réanimation Médicale Brabois
- D <sup>r</sup> Simon Lemoine	
- Pr Bruno Levy	
- Danièle Louria	
- D <sup>r</sup> Huguette Louis	
- D <sup>r</sup> Mathieu Mattei	
- D <sup>r</sup> Emmanuel Novy	

*« C'est à la dureté de son dos que l'on reconnaît la valeur d'un homme »*

*« Les cicatrices, c'est jeune qu'il faut les récolter, car en vieillissant, elles deviennent belles »*

*MC*

*« Il faut se tanner le cuir, Antoine ! »*

*MB*

*A Julie et Alice*

## Abréviations

AC : Adénylate Cyclase

ADP : Adénosine DiPhosphate

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate

$\beta$  AR : Récepteur  $\beta$ 1 Adrénergique

$\beta$  ARK :  $\beta$ -adrenergic receptor kinase

BNP : B Natriuretic Peptid

CaMKII : Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II

CARS : Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome

CD : Cluster Differentiation

CHG : Centre Hospitalier Général

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

DAMPs : Danger- Associated Molecular Patterns

DP : Double Produit

Ees : Elastance end systole

Emaw : Elastance maximale

EP : Récepteur PGE

ERA : Espèces Réactives de l'Azote

ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESPVR : End Systolic Pressure Volume Relationship

FE : Fraction d'Ejection

GMPc : Monophosphate de Guanosine Cyclique

GS : Glycogen Synthase

GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Péroxyde d'hydrogène

HMGB-1 : High Mobility Group Box 1

HSP : Heat Shock Proteins

IGS II : Indice de Gravité Standardisée II

IK1 : Inward Rectifier Current

IL : Interleukine

INF  $\beta/\gamma$  : Interferon  $\beta/\gamma$

IP : Récepteur PGI

IPC : Index de Puissance Cardiaque

ISRE : Interferon Stimulated Responsive Element

ITV : Intégrale Temps Vitesse

LBP : LPS Binding Protein

L-NAME : Le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester

L-NMMA : N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine

LPS : LipoPolySaccharide

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MARS : Mixed Anti-Inflammatory Response Syndrome

Micro-PET : Micro tomographe à émission de positons

MIF : Macrophage Migration Inhibitory Factor

MyD88 : Myeloïd Differentiation protein 88

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduite Oxydase

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor - $\kappa$ B

NK : Natural Killer

NO : Monoxyde d'Azote

NOS : NO synthase

NOS<sub>e</sub> : NO synthase endothéliale

NOS<sub>i</sub> : NO synthase inductible

NOS<sub>n</sub> : NO synthase neuronale

NOD-LRR : Nucleotide-Oligomerization Domain Leucine-Rich Repeat

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Anion superoxyde

OONO<sup>-</sup> : Péroxynitrite

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PAR : Protease Activated Receptor

PARP : Poly (ADP-ribose) Polymerase

PDE : PhosphoDiEstérasés

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E2

PGI<sub>2</sub> : Prostacycline

PI3K : PhosphatidyInositol-3-Kinase

PKA : Protéine Kinase A

PKG : Protéine Kinase G

P<sub>max</sub> : Pression maximale

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PPR : Pattern Recognition Receptors

P-V : Pression-Volume

RS : Reticulum Sarcoplasmique

RyR : Récepteurs à la Ryanodine

SERCA : Sarcoplasmic Réticulum Ca<sup>++</sup> ATPase

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

SOD : Superoxyde Dismutase

SOFA : Sepsis-related Organ Failure Assessment

SDMV : Syndrome de Défaillance Multi-Viscérale

SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

TCA : Temps de Céphaline Activé

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

TIR : Toll/Interleukine-1 receptor Domain

TLR : Toll Like Receptors

TnC/I/T : Troponine C,I, T

TNF  $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

TP : Temps de Prothrombine

PA : Activateurs du Plasminogène

PAI-1 : Plasminogen Activateur Inhibitor-1

PSPH : participant au Service Public Hospitalier

TAFI : Thrombin-Activatable Fibrinolysis Activator

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

TP: Récepteur du Thromboxane

TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>

UCP : Uncoupling Proteins

VES : Volume d'Ejection Systolique

VTS/DVG : Volumes Télésystolique et Télédiastolique du Ventricule Gauche

## Légendes

Figure 1 : Schéma simplifié de l'activation des voies de l'inflammation par la liaison TLR4/LPS.

Figure 2 : Cinétique schématique de l'orage cytokinique dans le choc septique d'après [60].

Figure 3 : Profil inflammatoire du patient en choc septique : 2 théories d'après [61].

Figure 4 : Effets physiopathologique du peroxy-nitrite dans l'état de choc septique.

Figure 5: Schéma simplifié de la cascade de la coagulation adapté de [110].

Figure 6: Représentation schématique de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie.

Figure 7: Représentation schématique des principaux sites d'action du monoxyde d'azote (NO), du peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) et du nitrosothiole (RSNO) sur la chaîne respiratoire adaptée de [122].

Figure 8: Schéma simplifié des principales structures impliquées dans la contraction de la cellule musculaire striée myocardique d'après [131].

Figure 9: Schéma simplifié de la contraction au niveau d'une cellule musculaire striée cardiaque d'après [131].

Figure 10: Schéma simplifié de la relaxation de la cellule musculaire myocardique d'après [131].

Figure 11: Schéma simplifié du transit calcique au sein du cardiomyocyte d'après [181].

Figure 12: Transduction du signal adrénérergique. Les catécholamines se fixent sur le récepteur  $\beta$  adrénérergique ( $\beta$  AR) adaptée de [181].

Figure 13 : Effets systémique d'une stimulation adrénérergique sur le profil phénotypique des lymphocytes Th d'après [271].



## Tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostics usuels du syndrome de réponse inflammatoire systémique, du sepsis, du sepsis sévère et du choc septique d'après [14].

Tableau 2 : Epidémiologie du choc septique de 1993 à 2011 d'après [19].

Tableau 3 : Rôle physiologique des eicosanoïdes adapté de [78].

Tableau 4 : Distribution du système  $\beta$ -adrénergique d'après [230].

Tableau 5 : Synthèses des études portant sur l'évaluation des effets de l'administration d'un traitement antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques dans des modèles animaux septiques sur les fonctions cardiaque, vasculaire, inflammatoire et sur la survie.

## Introduction

Des progrès significatifs ont été réalisés dans la prise en charge globale des patients hospitalisés en réanimation pour un choc septique. Ces progrès ont eu deux effets, à première vue, paradoxaux. D'une part, le taux de mortalité du choc septique au cours des quinze dernières années a diminué de 50% à 30% [1]. D'autre part, sur la même période de temps, malgré la baisse du taux de mortalité, l'incidence du choc septique, elle, a continué à augmenter passant de 8% à 15% [2, 3]. Les facteurs explicatifs mêlent, entre autres, une meilleure approche thérapeutique, mais surtout une meilleure reconnaissance, à un stade plus précoce, des patients en choc septique. Parallèlement, l'allongement de l'espérance de vie s'accompagne d'une augmentation du nombre de comorbidités ; terrain propice à l'évolution d'un sepsis en choc septique. Pour illustrer cette évolution, actuellement, plus de 60% des patients qui développent un choc septique aux Etats-Unis ont plus de 65 ans [4].

La diminution de la mortalité est le résultat d'une reconnaissance plus précoce mais surtout d'une démarche de prise en charge formalisée basée sur l'application des recommandations internationales [5]. Ces recommandations font plus appel au bon sens qu'à une réelle évolution des thérapeutiques. En effet, le texte de référence de ces recommandations, la Surviving Sepsis Campaign, est centré sur deux aspects de la prise en charge du patient en choc septique : la réanimation hémodynamique et le contrôle du site infectieux. Il est intéressant de souligner que l'actualisation régulière de ces recommandations sur la prise en charge du choc septique, ne retrouve aucune nouvelle thérapeutique sur les dix dernières années. Ces traitements sont tous axés sur le contrôle de l'excès d'inflammation induit par l'état de choc. Rétrospectivement, tous les essais thérapeutiques de ces nouvelles molécules se sont avérés être des échecs. La Drotrecogin alpha, une protéine C activée recombinante, dont l'autorisation de mise sur

le marché avait été obtenue pour le traitement du choc septique suite aux résultats de l'étude PROWESS en 2000, a finalement été retirée précipitamment du marché en 2013, dès la parution des résultats négatifs de l'étude de confirmation [6, 7]. De façon similaire, dans une étude multicentrique incluant près de 2000 patients en choc septique, l'Eritoran, molécule de structure lipidique qui empêche la fixation du lipopolysaccharide sur le récepteur Toll Like 4 (TLR4), n'était pas associée à une diminution du taux de mortalité [8]. Ainsi, même si la comparaison peut paraître extrême, le choc septique, dont la gravité réside dans l'excès d'inflammation, est orphelin d'un traitement réellement efficace.

Dans cette optique, de nouvelles voies de recherche sont nécessaires. Les  $\beta$ -bloquants sont des molécules thérapeutiques dont les effets ont largement été décrits dans la littérature. Outre les effets cardiovasculaires, cette classe de molécules présente aussi des effets intéressant la modulation du profil inflammatoire. Ces effets, qui diffèrent en fonction de la cardiosélectivité du récepteur  $\beta$  adrénergique bloqué, peuvent avoir une action anti-inflammatoire [9]. Dans ce contexte, l'évaluation de cette classe thérapeutique trouve sa justification pour la modulation du profil de l'inflammation en vue d'améliorer le pronostic des patients en choc septique.

## Doit-on redéfinir le choc septique ?

La définition du choc septique est un continuum physiopathologique dont le sepsis est le point de départ (tableau 1). Ce sepsis se définit comme la présence d'une infection probable ou documentée, associée à des signes d'inflammation systémiques et/ou à la présence d'atteintes d'organes.

La présence d'une dysfonction d'organes sévère ou des signes d'hypoperfusion, élève la gravité du sepsis à celle d'un sepsis sévère. Ce sepsis sévère n'est pas que le reflet d'un sepsis compliqué d'une hypotension artérielle mais peut aussi être en rapport avec les dysfonctions d'organes qu'il induit. L'hypotension artérielle qui reste le symptôme clinique cardinal répond à des critères précis : une pression artérielle systolique inférieure à 90 mmHg ou une pression artérielle moyenne inférieure à 70 mmHg. Chez le patient présentant une hypertension artérielle préexistante, une diminution de 40 mmHg de pression artérielle systolique est considérée comme significative.

Le choc septique se révèle être aussi essentiellement défini par des considérations hémodynamiques. Il s'agit d'un sepsis sévère avec des signes d'hypoperfusion qui persistent malgré l'administration d'une expansion volémique adéquate [10]. Ce cadre nosologique complexe qui essaye d'englober l'ensemble des situations cliniques rencontrées au lit du malade est imparfait. Ainsi, dans un travail clinique récent sur l'évaluation de la pertinence des critères du syndrome de réponse inflammatoire systémique, la présence de ces signes d'inflammation n'est pas retrouvée dans près d'un cas sur huit au diagnostic d'un sepsis sévère dans les 24 heures d'hospitalisation en réanimation [11]. Même si le pourcentage de choc septique était plus faible dans le groupe sans syndrome de réponse inflammatoire systémique, il n'en demeure pas moins que 42% des patients en sepsis sévère évoluaient vers un état de choc. La mortalité, bien que non négligeable (16%), était plus faible que dans la population présentant une réponse inflammatoire systémique au diagnostic (23%,  $p < 0.001$ ). A l'inverse, il faut

souligner que le taux de mortalité augmente de façon quasi linéaire de 13% avec le nombre de signes d'inflammation systémique. Intuitivement, la présence de signes de réponse inflammatoire systémique est pour le diagnostic de sepsis sévère associée à une excellente sensibilité mais possède finalement une spécificité médiocre. Les résultats de cette étude confirment finalement que le choc septique n'est pas uniquement une pathologie dont la définition inclut un excès d'inflammation. Les connaissances accumulées depuis plus de 20 ans sur le sujet montrent qu'au départ d'un sepsis, les patients initient dans le même temps une réponse pro- et anti-inflammatoire [12]. Le degré d'inflammation est fonction : des prédispositions innées immunitaires cellulaires, hautement variables d'un sujet à un autre, mais aussi du stimulus infectieux incriminé. En conséquence, réduire le diagnostic du choc septique à la présence indispensable de signes inflammatoires ne peut être que délétère. Cette redéfinition s'impose donc et elle se doit d'inclure l'hétérogénéité physiopathologique et clinique maintenant reconnue du choc septique [13].

Tableau 1 : Critères diagnostics usuels du syndrome de réponse inflammatoire systémique, du sepsis, du sepsis sévère et du choc septique d'après [14]

Stades	Critères
Syndrome de réponse inflammatoire systémique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fréquence cardiaque &gt; 90/min</li> <li>-Fréquence respiratoire &gt; 20/min ou PaCO<sub>2</sub>&lt; 32 mmHg</li> <li>-Leucocytes &gt; 12000/mm<sup>3</sup> ou &lt; 4000 /mm<sup>3</sup></li> <li>-Fièvre &gt; 38°C ou &lt;36°C</li> </ul>
Sepsis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Foyer infectieux documenté ou hautement suspecté</li> <li><i>Signes généraux</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fièvre &gt; 38,3°C</li> <li>Hypothermie &lt; 36°C</li> <li>Tachypnée</li> <li>Atteinte des fonctions supérieures</li> <li>Œdème périphérique ou bilan entrée-sortie positif de 20 ml/kg sur 24 heures</li> <li>Hyperglycémie (&gt; 1,4 g/l) en l'absence de diabète</li> </ul> </li> <li><i>Signes inflammatoires</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Leucocytes &gt; 12000/ml ou &lt;4000/ml</li> <li>Leucocytes normaux avec plus de 10% de formes immatures</li> <li>C réactive protéine ou Procalcitonine &gt;2SD des valeurs normales</li> </ul> </li> <li><i>Signes hémodynamiques</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hypotension artérielle (PAS&lt; 90 mmHg, PAM&lt;70 mmHg ou diminution de 40 mmHg de la PAS chez le sujet hypertendu)</li> </ul> </li> <li><i>Signes de dysfonction d'organes</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hypoxémie artérielle (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 300 mmHg)</li> <li>Oligurie (diurèse &lt;0.5 ml/kg/h depuis 2 heures malgré une volémie adéquate)</li> <li>Créatinine augmentée de plus de 0,5 mg/dl</li> <li>Coagulopathie (International Normalized Ratio &gt; 1,5)</li> <li>Iléus</li> <li>Thombopénie &lt; 10000 /µl</li> <li>Hyperbilirubinémie totale &gt; 4 mg/dl</li> </ul> </li> <li><i>Signes d'hypoperfusion</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hyperlactatémie &gt; 1 mmol/l</li> <li>Marbrure ou retard de coloration capillaire</li> </ul> </li> </ul>
Sepsis sévère	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sepsis responsable d'une hypotension et/ou</li> <li>-Hyperlactatémie</li> <li>-Diurèse &lt;0.5 ml/kg/h depuis plus de deux heures malgré une expansion volémique adéquate</li> <li>Insuffisance respiratoire aiguë avec un PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 250 mmHg en l'absence de pneumonie</li> <li>Insuffisance respiratoire aiguë avec PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 200 mmHg en présence d'une pneumonie</li> <li>Créatinémie &gt; 2 mg/dl</li> <li>Bilirubine &gt; 2 mg/dl</li> <li>Plaquette &lt; 100000 / ml</li> <li>Coagulopathie avec un International Normalized Ratio &gt; 1.5</li> </ul>
Choc septique	Sepsis sévère qui persiste malgré une expansion volémique adéquate

SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

## **Epidémiologie du choc septique**

Décrire l'épidémiologie du choc septique est d'une importance considérable lorsque l'on se rappelle que le sepsis sévère aux Etats-Unis représente une des dix premières causes de mortalité avec un coût annuel de 24,3 milliards de dollars [15].

Les données épidémiologiques ont en général trois origines de valeurs différentes : les études prospectives longitudinales observationnelles, les bases de données essentiellement nord-américaines ou néo-zélandaises, et enfin, de façon forcément biaisée, les études randomisées thérapeutiques. On considèrera qu'un choc septique n'est pris en charge que dans deux types de secteur : la Réanimation et les services d'accueil des urgences.

Trois caractéristiques fondamentales ont modifié la population de choc septique en réanimation : le vieillissement de la population, les moyens diagnostiques techniques qui sont plus performants et l'impact des programmes thérapeutiques du choc septique. Ces éléments justifient la remise à jour régulière des données épidémiologiques sur le choc septique.

### **L'infection, une complication fréquente de la réanimation**

En terme de prévalence, c'est à partir des résultats de l'étude SOAP que l'on dispose des données les plus précises sur l'épidémiologie globale des patients infectés en réanimation. Cette étude de type point de prévalence inclut 1265 unités de réanimation dans le monde. Ainsi, sur un jour donné en 2007, un patient sur deux hospitalisé en réanimation (7087/13796 patients) est considéré infecté, principalement du poumon dans 63,5%. La mortalité est augmentée par la présence d'une infection à 33,1% *versus* 14,8% dans la population non infectée avec un odds ratio significatif ajusté aux cofacteurs à 1.51 [1.36-1.68] [16].

## Incidence du choc septique en France

Il existe neuf études sur l'épidémiologie du choc septique dans les services de réanimation en France (tableau 2). D'autres études se sont intéressées à un sous-type de population comme les patients atteints de cancers ou de cirrhoses [17, 18]. Il est intéressant de noter que très souvent dans les études épidémiologiques sur le choc septique, les patients en sepsis sévères sont inclus. Pourtant cette population moins grave sur le plan clinique n'est que rarement hospitalisée en réanimation. Il peut exister une confusion sur les données présentées dans cette thématique entre les patients atteints de sepsis sévères et ceux en choc septique.



Tableau 2 : Epidémiologie du choc septique de 1993 à 2011 d'après Quenot *et al.* [19]

Auteurs	Type d'étude, durée	Type de Réanimation	Population	Survenue de sepsis	Mortalité
Brun-Buisson <i>et al.</i> 1995[20]	Prospective-multicentrique- 31 jours en 1993	170 services 62% polyvalentes 20% chirurgicales 18% médicales	11828 patients /1064 sepsis sévères	Prévalence 9% IC(8.5-9.5)	Mortalité à 28 jours : 56% IC(52-60)
Brun-Buisson <i>et al.</i> 1996[21]	Prospective-multicentrique- 31 jours en 1993	24 hôpitaux	85750 patients 842 bactériémies, 221 sepsis sévères avec bactériémie	Prévalence Bactériémie: 9,8 IC(9.2-10.5) Sepsis sévère et bactériémie : 2.6(IC2.2-2.9) pour 1000 admissions	Mortalité à 28 jours : Bactériémie : 25% IC(23-29) Bactériémie et sepsis sévère avec bactériémie 54%(48-61)
Alberti <i>et al.</i> 2002[22]	Prospective-multicentrique-internationale- 1997 à 1998	27 hôpitaux dans 8 pays	14364 admissions 1115 sepsis 944 sepsis sévère 1180 chocs septiques	Prévalence globale : 21%	Mortalité en réanimation : Sepsis : 26.8% IC(20.1-33.5) Sepsis sévère 33.6% IC(25.7-41.4) Choc septique: 57,4% IC(54.4-71.1)
Annan <i>et al.</i> 2003[23]	Rétrospective-multicentrique- 1993 à 2000	22 réanimations	100554 admissions 8251 choc septiques	Prévalence 8.2% Incidence 1993 : 7% 2000 : 9.7%	Globale : 60.1% 1993 : 62.7% IC(59.8-65.6) 2000 : 55.6% IC(53.4-57.8)
Brun-Buisson <i>et al.</i> 2004[2]	Prospective-multicentrique- 2 semaines	213 réanimations 95 réanimations de CHU 97 réanimations de CHG 14 réanimations de PSPH	3738 patients 621 sepsis sévères	Prévalence de 16,6%	Mortalité à 30 j : 35% à 2 mois : 46.7%
Guidet <i>et al.</i> 2005[24]	Rétrospective-multicentrique- 1997 à 2001	35 réanimations 23 réanimations de CHU 8 réanimations de CHG	96193 admissions 20963 sepsis sévères	Prévalence sepsis sévère 21,4% Incidence 1997 : 17,2% 2001 : 18,7%	Mortalité en réanimation : Sepsis sévère 5,5% Choc septique 1997 : 44.7% 2001 : 40.1%
Adrie <i>et al.</i> 2007[25]	Rétrospective cas- témoin-multicentrique 1997 à 2005	12 réanimations 7 réanimations de CHU 5 réanimations de CHG	4860 patients 1692 sepsis sévères	Prévalence sepsis sévère 34% Choc septique 10%	Mortalité Sepsis sévère hospitalière 29%
Zahar <i>et al.</i> 2011 [26]	Rétrospective-multicentrique- 1996 à 2009	12 réanimations 7 réanimations de CHU 5 réanimations de CHG	11992 patients 3588 sepsis sévères	Prévalence sepsis sévère 30% Choc septique 10,7%	Mortalité hospitalière sepsis sévère 30,4% Choc septique 42%
Quenot <i>et al.</i> 2013[3]	Prospective-multicentrique- 2009 à 2011	14 réanimations 5 CHU 5 CHG	10941 patients 1495 choc septiques	Incidence 13,5 %	Mortalité en réanimation : 39.5% à 28j 42% hospitalière 48.7%

CHU : Centre Hospitalier Universitaire ; CHG : Centre Hospitalier Général ; PSPH : participant au Service Public Hospitalier

La fréquence du choc septique au cours du temps a augmenté de 8.2 pour 100 admissions en 1993 à 15.4 pour 100 admissions en 2011 avec une nette accélération au début du XXI<sup>e</sup> siècle. La meilleure reconnaissance du choc septique secondaire à la

diffusion de des conférences de consensus de type « Surviving sepsis campaign » peut expliquer cette augmentation [5].

### **Typologie des malades à l'admission**

Il existe une très nette évolution du type de patients pris en charge en réanimation pour un choc septique. Les patients sont admis avec un âge de plus en plus avancé. Ainsi le pourcentage des patients de plus de 60 ans est passé de 57.3% en 1993 à 71.2 % en 2011 [3, 23]. Les patients restent majoritairement de sexe masculin à près de 64% en 2011 [3]. Par ailleurs, les comorbidités sont de plus en plus fréquentes, passant de 51% dans les années 2000 à près de 67% en 2011 [17, 25]. Par ailleurs, les patients admis présentent le plus souvent un haut degré d'immunodépression soit thérapeutique soit en rapport avec une pathologie cancéreuse solide ou une hémopathie maligne. Leur taux a ainsi augmenté de 22% dans l'étude d'Annane *et al.* en 2000 à plus de 30% en 2011 dans le travail prospectif de Quenot *et al.* [3, 23]. Avec des patients plus âgés, plus comorbides, incluant des pathologies cancéreuses à un stade avancé et même des hémopathies malignes, le score d'indice de Gravité Standardisée II (IGS II) des patients admis pour choc septique a augmenté de 57 dans les années 1993-2000 à près de 67 dans les années 2009-2011 [3, 23].

### **Principales étiologies infectieuses**

La source de l'infection ne s'est pas ou peu modifiée au cours du temps. Ainsi, en 1997-1998, déjà, par ordre décroissant de fréquence, les foyers respiratoires, les infections digestives, urinaires, et enfin les bactériémies représentaient plus de 80% des étiologies infectieuses des patients en choc septique [22]. Cette répartition est identique en 2011 [3]. Néanmoins, la proportion des infections urinaires responsables d'un choc septique tend à diminuer à l'inverse des foyers respiratoires. La bactériémie est associée à une plus grande mortalité des patients en choc septique [20, 21]. Ces bactériémies sont

logiquement surreprésentées dans les populations présentant un terrain comorbide sous-jacent : hémopathie maligne, cancer solide ou insuffisance hépatique chronique [17, 18, 21, 27]. Ainsi, chez des patients hospitalisés pour choc septique et atteints d'une hémopathie maligne, une étiologie pulmonaire était retrouvée dans 54% des cas et une bactériémie était documentée dans 55% [27].

Si la répartition des foyers infectieux s'est globalement maintenue sur les vingt dernières années, le taux de documentation bactériologique s'est amélioré avec l'essor des nouvelles techniques de diagnostic bactériologique. Ainsi, une bactériologie était établie chez uniquement 31 % des patients en choc septique en 1997, alors que ce taux s'élève à près de 67% en 2011 [3, 22]. Sur la même période de temps, la répartition des infections à Gram positif et à Gram négatif s'est inversée. De 1997 à 2011, les infections à Gram positif ont tendance à stagner de 32% à 36,4% tandis que les infections à Gram négatif ont augmenté de 31% à 48,7% [3, 22]. Cette inversion de la répartition des germes diagnostiqués est à mettre en relation avec une proportion de plus en plus importante de patients immunodéprimés à risque de contracter des germes nosocomiaux de type Gram négatif non fermentant comme le *Pseudomonas aeruginosa*. D'autre part, l'impact des politiques d'hygiène hospitalière a été responsable d'une diminution du taux d'infections à germe de type *Staphylocoque aureus* résistant à la méticilline.

### **Quelles sont les complications associées au choc septique ?**

Le choc septique est responsable de défaillances multi-organes qui nécessitent fréquemment d'être supplées. Ainsi dans l'étude de Annane *et al.* sur la période 1993-2000, 79.1% des patients en choc septique étaient ventilés mécaniquement, 84.8% nécessitaient des vasopresseurs et 25.1% une épuration extrarénale [23]. La gravité des patients s'est maintenue au cours du temps avec, en 2011, 83.9% de patients ventilés,

100% sous vasopresseurs et 52% sous épuration extrarénale. Il est intéressant de noter que 63% des patients étaient considérés comme ayant une insuffisance surrénalienne relative et recevaient une opothérapie substitutive [3].

### **Une mortalité en diminution.**

Sur les vingt dernières années, la mortalité du choc septique est en constante diminution passant de 60.1% en 1993 à 39.5% en 2011. Dans les suites, la mortalité hospitalière tend aussi à diminuer de 62% en 1997 à 48.7% en 2011 [3, 20].

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent expliquer cette baisse de la mortalité dans le choc septique :

En premier lieu, l'étude de Rivers en 2001 sur la prise en charge des patients en choc septique aux urgences a mis en exergue l'importance d'une prise en charge hémodynamique et anti-infectieuse précoce. Bien plus que les résultats positifs en terme de mortalité, sur une population non-réanimée en pré-hospitalier, et donc non comparable avec notre typologie de patients en France, ce travail a souligné l'importance de la « golden hour » modifiant ainsi profondément les mentalités [28].

Dans les suites de cette étude, la reconnaissance du choc septique s'est améliorée dans les services d'urgences, entraînant une augmentation du nombre d'hospitalisations de ces patients [29].

L'impact des nouvelles thérapeutiques apparaît dans le contexte plus modéré. Outre l'échec de la protéine C activée, l'opothérapie substitutive de l'insuffisance surrénalienne et le contrôle glycémique sont probablement les deux seules modifications qui ont éventuellement pu avoir un impact favorable sur la mortalité [7, 30, 31].

Enfin, la diffusion de la conférence de consensus « Surviving Sepsis Campaign » a probablement plus impacté la mortalité que toutes les nouvelles thérapeutiques sur les vingt dernières années. Qui plus est, l'appropriation de ces recommandations par les

équipes soignantes médicales et paramédicales en réanimation mais aussi dans les services d'urgence a été évaluée à de nombreuses reprises, confirmant ainsi son impact bénéfique [32, 33].

La mortalité en France des patients en choc septique est comparable aux données épidémiologiques des études nord-américaines et néo-zélandaises. Ainsi, une méta-analyse récente sur la période 1991-2009 retrouve une diminution de la mortalité de 46,9% sur le segment 1991-1995 à 29,3% sur le segment 2006-2009. Parallèlement, la gravité des patients a augmenté avec une mortalité prédite de 49,8% à 54,6% sur les mêmes segments temporels [34].

### **Analyse de la mortalité dans les études multicentriques**

La revue de la littérature retrouve des résultats discordants entre les études épidémiologiques et les essais cliniques multicentriques. Il faut souligner que la mortalité du choc septique dans les études randomisées est bien plus basse que ce qui est rapporté dans les descriptions de cohorte. Deux exemples récents, les études PROCESS et ARISE, soulignent ce fait [35, 36]. Ces travaux portaient sur l'évaluation de l'impact d'un protocole de réanimation précoce centré sur des objectifs. Ces travaux évaluaient de façon multicentrique les conclusions de l'étude de Rivers publiée en 2001 [28]. Ainsi la mortalité à 60 jours dans l'étude PROCESS était, quel que soit le groupe, inférieure à 22%. Dans l'étude ARISE, la mortalité à 90 jours était aussi toujours inférieure à 20%. Les explications à ce faible taux de mortalité sont nombreuses mais démontrent surtout qu'un patient inclus dans un protocole de recherche est un patient « choisi » sur des critères préétablis et que l'effet protocole qui peut se résumer par le fait que l'on s'occupe du patient est loin d'être négligeable. Cela met aussi en exergue toute la difficulté de transposer les résultats de la recherche à la pratique quotidienne.

## Facteurs pronostiques dans le choc septique

Grace aux études épidémiologiques, les facteurs pronostiques dans le choc septique sont de mieux en mieux identifiés. Quelle que soit la période de temps étudiée, les scores de gravité sont des marqueurs pronostiques fiables. Ainsi le score IGS 2 et le Sepsis-related Organ Failure Assessment score (SOFA) sont systématiquement retrouvés comme des marqueurs pronostiques. Le terrain sous-jacent est aussi fortement associé à la mortalité : l'âge, le sexe, l'état général et la présence d'au moins une comorbidité est associée à un pronostic défavorable [3]. De même, certains sous-groupes de populations ont été spécifiquement étudiés. Ainsi, le pronostic des patients cirrhotiques présentant un choc septique était réputé effroyable. S'il s'agit effectivement d'une population avec une mortalité élevée à 30 j d'environ 65% *versus* 40% dans une population équivalente mais sans cirrhose, le pronostic a évolué favorablement dans le temps passant d'une mortalité de 73.8% en réanimation en 1998 à 42.2% en 2010 [17]. Dans un autre travail rétrospectif, unicentrique, concernant les malades atteints d'hémopathie malignes qui sont admis en réanimation pour choc septique, la mortalité restait élevée à 65% avec néanmoins une diminution sur la période 1995-1997 de 79,4% à 55,5% sur la période 1998-2000 [27].

En résumé, l'intérêt de la description précise de la démographie des patients hospitalisés pour sepsis sévère compliqué ou non de choc septique est crucial pour mieux déterminer les besoins en terme de santé publique et ainsi allouer de façon plus efficace des ressources financières de plus en plus restreinte.

## Physiopathologie du choc septique

Nous présenterons dans un premier temps un rappel sur la réaction hôte-pathogène et les mécanismes qui mènent à la dysfonction multi-organes. Nous préciserons plus spécifiquement les physiopathologies de l'insuffisance cardiaque et circulatoire

### Initiation de la réponse inflammatoire par l'immunité innée : Réaction Hôte-Pathogène

#### Toll like receptors, Pathogen-Associated Molecular Patterns et les Danger-Associated Molecular Patterns

L'initiation de la réponse de l'hôte dans le sepsis ou dans l'agression tissulaire implique trois grandes familles de récepteurs appelés Pattern Recognition Receptors (PPR): Les Toll-Like Receptors (TLRs) ; les protéines de type nucleotide-oligomerization domain leucine-rich repeat (NOD-LRR) et enfin la cryopirine aussi appelée NALP3.

Plus spécifiquement, les TLRs sont des récepteurs extrêmement conservés entre les espèces animales. Ces récepteurs initient la réponse immunitaire innée et régulent la réponse adaptative. Treize TLRs sont décrits chez les mammifères [37]. Ces récepteurs transmembranaires ont une structure composée d'un domaine transmembranaire avec un domaine extracellulaire associant des répétitions de motifs riches en leucine. La courte portion transmembranaire est reliée à un domaine intracellulaire semblable à celle du récepteur Inteleukine-1 (IL1). Ce domaine commun est nommé Toll/Interleukine-1 receptor Domain (TIR). A noter que TLR2 reconnaît plus spécifiquement les composants des bactéries Gram positif [38].

Les ligands de ces récepteurs se séparent en deux classes : Les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) et les Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs).

Les PAMPs sont des composants bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. Il peut d'agir du lipopolysaccharide pour les bactéries à Gram négatif, l'acide lipoteichoïque pour les bactéries à Gram positif, le zymosan, les flagellines, les porines, les diacyl

lipopeptides, l'ADN bactérien qui contient des motifs non méthylés répétés de type dinucléotidique CpG et que l'on ne retrouve dans l'ADN d'aucun mammifère.

Les DAMPs sont des molécules endogènes libérées à la suite d'un stress cellulaire. On y retrouve ainsi : l'héparane sulfate, l'acide hyaluronique, le fibrinogène, le surfactant A et surtout le High Mobility Group Box 1 (HMGB-1). HMGB-1 interagit normalement avec le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène. Il est libéré anormalement par les cellules nécrotiques et joue un rôle pro-inflammatoire majeur en agissant sur TLR4 [39].

### **Voie de signalisation des TLRs : l'exemple du lipopolysaccharide (LPS) et de TLR4 (figure 1)**

Les réponses induites par les PAMPs diffèrent selon les couples TLRs/ligands. Nous prendrons l'exemple classique de TLR4 et du LPS. Le LPS est un composant de la paroi des bactéries Gram-négatif particulièrement impliqués dans le développement des signes d'état de choc. Lorsqu'il est libéré dans la circulation sanguine, le LPS se fixe au LPS Binding Protein (LBP) qui est une protéine circulante synthétisée par la foie. Le complexe LPS/LBP est reconnu par un récepteur membranaire Cluster Differentiation 14 (CD14). L'ensemble de ces éléments sont indispensables à l'activation de la voie de signalisation initiée par TLR4 [40]. TLR4 ne reconnaît néanmoins le LPS qu'en présence d'un deuxième polypeptide, MD-2 qui se fixe au domaine extracellulaire de TLR4 et qui permet de lier les lipides du LPS [41].

TLR4, une fois activé, transmet le signal de production de cytokines pro- inflammatoires *via* l'activation de nombreux adaptateurs, qui contiennent des domaines TIR comme le Myeloïd Differentiation protein 88 (MyD88) et TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF). Ces deux adaptateurs vont permettre d'aboutir par l'intermédiaire de toute une cascade de signalisations à l'activation, respectivement, du facteur de transcription Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et à l'activation de l'Interferon Stimulated



Responsive Element (ISRE). La production de cytokines pro-inflammatoires est alors stimulée et en particulier : IL1 $\beta$  et le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) par NF- $\kappa$ B et l'interféron  $\beta$  (INF  $\beta$ ) par ISRE.

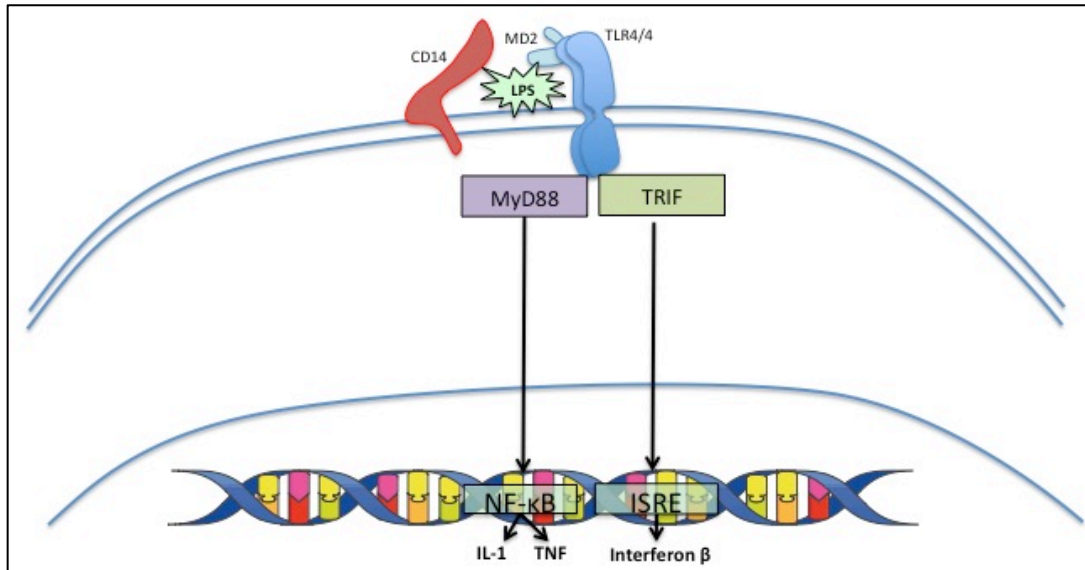


Figure 1 : Schéma simplifié de l'activation des voies de l'inflammation par la liaison TLR4/LPS.

De façon schématique, les NOD-LRR, et en particulier NOD1 et NOD2, sont des censeurs intracellulaires qui permettent la reconnaissance de composants du peptidoglycane, un constituant des parois bactériennes. Identiquement à TLR4, Les NODs activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B [42].

La cryopirine ou NALP3 est un détecteur du peptidoglycane dans le cytoplasme qui sert d'armature au complexe d'activation de la caspase 1. L'ensemble formant un inflammasome. La caspase 1 est nécessaire à la maturation des précurseurs de IL-1 $\beta$  et de IL18 qui induit la production de l'interféron  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) [43].

### Immunité adaptative

L'activation de l'immunité adaptative à partir de l'immunité innée trouve son origine dans l'expression de fragments antigéniques à la surface des cellules présentatrices d'antigène incluant les cellules dendritiques myéloïdes qui dérivent des cellules

monocytaires. HLA-DR est une protéine appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de type II indispensable à la présentation antigénique à la surface des cellules dendritiques myéloïdes. HLA-DR a une expression augmentée par différents stimuli dont l'IL1, INF $\gamma$  ou le LPS. A l'inverse, le Transforming Growth Factor $\beta$  (TGF $\beta$ ), l'IL10 et le monoxyde d'azote (NO) ont tendance à diminuer l'expression membranaire d'HLA-DR [44]. La diminution d'expression d'HLA-DR est un marqueur d'immunoparalysie associé au risque d'infection secondaire [45].

Sans rentrer dans les détails mécanistiques, les cellules Natural Killer (NK) sont un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles participent à la reconnaissance antigénique mais peuvent aussi être activées par les cellules présentatrices d'antigène. La production d'INF $\gamma$  lorsque les cellules NK sont activées participe à la maturation des cellules lymphocytaires T.

L'immunité adaptative activée par les types cellulaires présentés comporte les cellules lymphocytaire T et B dont nous ne détaillerons pas les différents mécanismes et voies de signalisation [46].

## **De l'inflammation à la défaillance multi-viscérale**

Les mécanismes qui mènent de l'excès d'inflammation produit par le processus septique à la défaillance multi-viscérale restent encore largement méconnus. Ainsi, c'est l'intrication de plusieurs mécanismes physiopathologiques qui est à l'origine de ce syndrome aux contours mal définis et qui aboutit le plus souvent au décès.

### **Participation génétique**

Parmi les patients présentant un choc septique, l'hétérogénéité évolutive du profil inflammatoire impacte directement le pronostic et suggère l'importance de facteurs prédisposant génétiques. Ainsi, dans une petite cohorte de patients septiques, seuls ceux qui ont des taux élevés de TNF $\alpha$  et d'IL6 évoluent vers la défaillance multi-organes et le

décès [47]. Il a été démontré par la suite que l'existence de polymorphisme génétique est associée à la mortalité dans l'état de choc septique [48-52]. La présence de mutations affectant la portion extracellulaire de TLR4 affecte la réponse au LPS chez l'homme [48]. Dans un travail publié en 2014, Meyer *et al.* ont démontré qu'un déséquilibre allélique dans le gène codant pour le récepteur antagoniste de l'IL1, chez les sujets européens, est à l'origine d'une augmentation du taux plasmatique de ce récepteur. Dans cette population comparée à celles ne présentant pas le variant allélique, la résolution du choc est plus rapide et une diminution de la mortalité est observée [51]

## **Participation des médiateurs de l'inflammation**

### ***Les cytokines***

Les médiateurs de l'inflammation ont longtemps été résumés à la synthèse excessive d'IL1 et de TNF $\alpha$  lors de la phase initiale du choc septique. La réalité est bien plus complexe et implique de très nombreux médiateurs dont la liste est mise à jour régulièrement [53]. Le choc septique est une maladie dont la dynamique est caractérisée par un déséquilibre de la balance anti- et pro- inflammatoire évolutif dans le temps [54].

Nous nous limiterons ici à la présentation des cytokines les plus connues, bien qu'une littérature extensive existe sur la thématique. Ainsi, la gravité du choc est, en partie du moins, d'une part reliée à la synthèse excessive de médiateurs pro-inflammatoires, à la phase initiale, et d'autre part, à la période d'immunosuppression qui s'ensuit et qui est responsable de sepsis secondaires. La preuve de ce déséquilibre prolongé dans le temps est fournie par l'échec, sur la survie à 28 jours, des thérapies ciblées comme les anticorps, « anti-inflammatoire », anti-TNF $\alpha$  administrés précocement chez les patients en choc septique [55]. Dans un travail expérimental sur un modèle de choc septique par CLP chez la souris, à 24 heures, il était observé une élévation commune des cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et l'éotaxine) et anti-inflammatoires (IL1ra, srTNF $\alpha$ ,

IL10). Si le pic des cytokines pro-inflammatoires s'atténuait en 48 heures, celui des cytokines anti-inflammatoires persistait sur plusieurs jours. La mortalité était, quant à elle, directement associée à l'intensité des pics aussi bien pro- qu'anti-inflammatoires [12]. On comprend donc que la gravité de l'état de choc ne se résume pas uniquement à l'intensité de la réponse pro-inflammatoire biologique. Par ailleurs, la valeur pronostic des cytokines pro- et anti- inflammatoires dépend aussi du moment de la mesure par rapport au début du choc. Néanmoins, en général, des valeurs élevées, par exemple d'IL6, à la phase précoce sont fréquemment associées à la défaillance multi-organes et à la mortalité chez l'homme [56]. IL10, cytokine anti-inflammatoire, est aussi associée, pour certains auteurs, sur des modèles expérimentaux, à la défaillance multi-organes, en particulier lorsque la valeur de son taux est élevée en phase tardive du choc [57]. De façon contre-intuitive, IL6 est nécessaire dans certains modèles non septiques au déclenchement d'une réponse anti-inflammatoire [58].

Bone, en 1996, a très bien résumé la complexité de l'orage cytokinique qui survient durant l'état de choc septique en conceptualisant un premier stade de réponse inflammatoire exagéré (« SIRS » : systemic inflammatory response syndrome), suivi d'un stade mixte anti- et pro-inflammatoire (« MARS » mixed anti-inflammatory response syndrome) qui devient finalement majoritairement anti-inflammatoire (« CARS » : compensatory anti-inflammatory response syndrome) (figure 2). Les conséquences d'organes de ces états inflammatoires varient en fonction de leurs intensités sous la dépendance de facteurs multiples, dont la susceptibilité génétique [59].

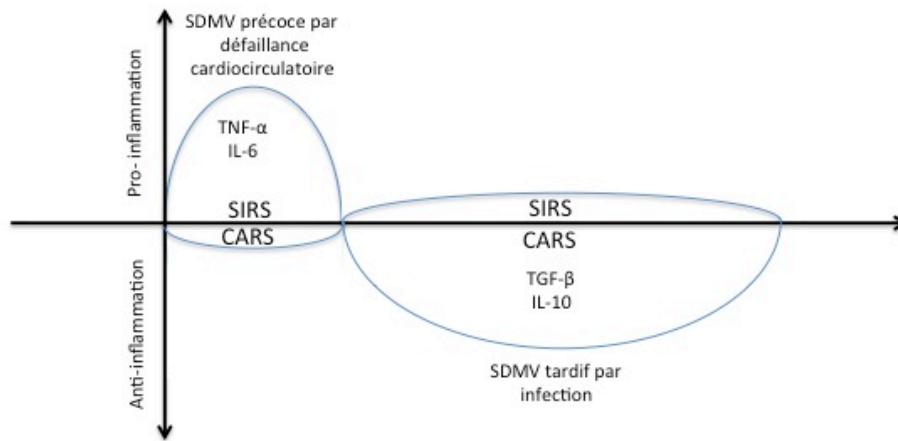


Figure 2 : Cinétique schématique de l'orage cytokinique dans le choc septique d'après [60].

Cette présentation classique de la réponse immunitaire est aujourd'hui battue en brèche. La survenue d'un choc septique n'est probablement pas associée à une réponse en deux temps comme présenté par Bone mais plus sûrement par une activation globale à la fois pro et anti- inflammatoire (figure 3).

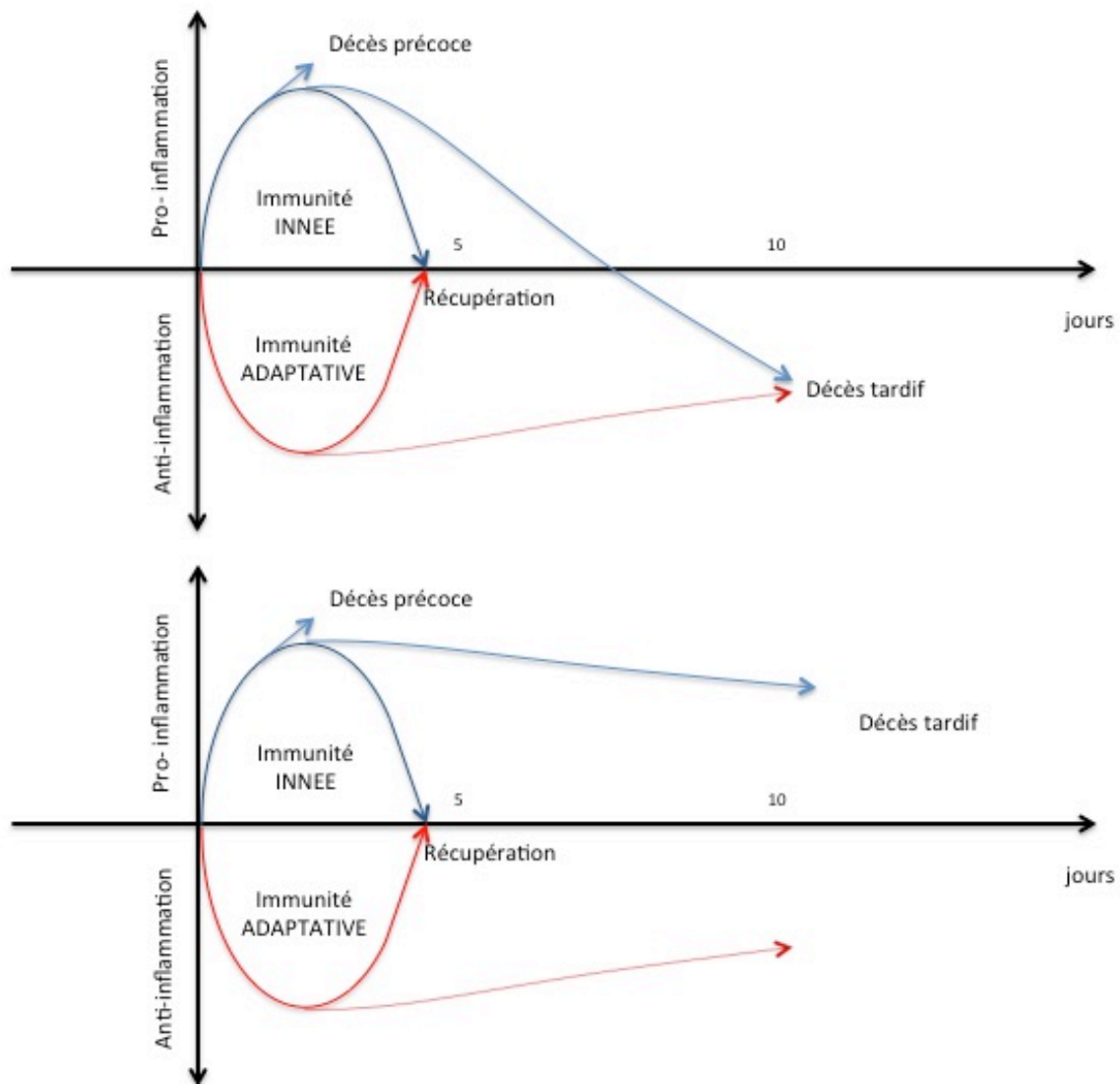


Figure 3 : Profil inflammatoire du patient en choc septique : Deux théories d'après [61]. Dans le choc septique, l'inflammation est à la fois activée sur le versant pro- et sur le versant anti-inflammatoire. Deux théories évolutives sont possibles. Panel du haut : les cytokines pro-inflammatoires sont relarguées de façon massive par les cellules de l'immunité innée : macrophages, monocytes. L'intensité de cette réponse dépend de l'infection, du terrain acquis (comorbidités) mais aussi inné (génétique). Le décès précoce est secondaire aux défaillances d'organes en rapport avec l'excès d'inflammation. La récupération se fait aux alentours du cinquième jour. Le décès tardif est associé à l'immunoparalysie responsable d'une immunodépression. Le décès étant souvent secondaire aux infections nosocomiales. Dans le panel du bas : la phase initiale

des cinq premiers jours est identique, mais le décès tardif est lui secondaire à la persistance d'un excès global à la fois d'anti- et de pro-inflammation.

### *Le Monoxyde d'Azote*

Le monoxyde d'azote est une petite molécule lipophile produite à partir de l'arginine sous contrôle de trois types de NO synthases (NOS) : la NOS endothéliale (NOSe), la NOS inductible (NOSi) et la NOS neuronale (NOSn) [62]. Nous nous intéressons essentiellement dans le cadre pathologique du choc septique à la NOSe et à la NOSi. Physiologiquement, la NOSe se retrouve sur l'ensemble de l'endothélium vasculaire tandis que la NOSi a une localisation qui se limite au niveau de l'épithélium respiratoire. La NOSe ne produit du NO qu'en quantité limitée lorsque la concentration cytosolique de calcium s'élève et donc de façon intermittente. A l'inverse, les stimulus inflammatoires ou infectieux (LPS, acide lipotéichoïque, cytokines, radicaux libres...) entraînent une activation, indépendante du transit calcique, de la NOSi qui se met à produire ainsi du NO à haut débit. Le stimulus inflammatoire septique ou non, entraîne une augmentation de l'expression de la NOSi sur tout un ensemble de type cellulaires tels que le cœur, les cellules musculaires lisses, l'endothélium, le rein, le foie,... [63].

Les effets du monoxyde d'azote sont répartis en effets directs et indirects.

- L'effet le plus connu est direct et correspond à l'activation ou à l'inhibition d'enzymes héminiques. On retiendra que le NO entraîne l'activation de la guanylate, cyclase soluble à l'origine de plusieurs effets physiologiques :
  - la relaxation musculaire lisse vasculaire [64] ;
  - l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [65] ;
  - l'inhibition des leucocytes à la paroi endothéliale [66].

En quantité trop importante, le NO peut entraîner une vasodilatation inadaptée ou comporte le risque d'inhiber des enzymes clefs du métabolisme énergétique oxydatif de la chaîne respiratoire [67].

Le NO a donc des effets à la fois bénéfiques et toxiques en fonction de la quantité produite.

- Les effets indirects du NO se font par la formation avec l'oxygène de molécules intermédiaires d'oxydes d'azote tels que l'oxyde nitreux. Ces molécules ont une forte affinité pour les groupes thiols et peuvent donc avoir des effets inhibiteurs par exemple de la glycolyse (inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase par nitrosylation) [62]. Néanmoins, le principal effet indirect du NO se fait par la réaction de cette molécule avec l'anion superoxyde  $O_2^-$  pour la formation de péroxynitrite (détaillé dans le chapitre suivant).

L'inhibition de la NOS a été un objectif thérapeutique logique et exploré à la fois sur le plan expérimental et clinique. Le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ou le N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) sont des inhibiteurs compétitifs puissants de la NOS. Tous ont démontré expérimentalement et cliniquement une réversion des effets vasodilatateurs avec une normalisation de la pression artérielle sans pour autant être associés dans les essais cliniques à une amélioration de la mortalité [68-74]. Le NO participe donc, de par sa production intense au cours du choc, à l'évolution vers un état de défaillance multiviscérale.

### *Espèce Réactive de l'Oxygène (ERO) et de l'Azote (ERA)*

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont initialement décrites comme des molécules aux effets uniquement pathologiques. En sus de leurs effets irréversibles pathologiques sur les structures cellulaires, les ERO ont aussi un rôle physiologique, indispensable sur les voies de la signalisation.

De façon schématique, les ERO et ERA comprennent les radicaux hydroxyl ( $OH\bullet$ ), les



péroxy-nitrites ( $\text{OONO}^-$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), etc. Les ERO et ERA sont produits dans différentes localisations cellulaires mais essentiellement par la mitochondrie lors de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire. La Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduite oxydase (NADPH) est à l'origine par exemple de la production d' $\text{O}_2^-$ . La fonction de phagocytose est aussi à l'origine de la production d' $\text{O}_2^-$  qui est bactéricide. Enfin, les ERO augmentent l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, l'apoptose et, globalement, prolongent le processus inflammatoire [75]. Au moins 10 sites de production ont été identifiés au niveau de la mitochondrie et globalement entre 0,1 et 0,2 % de l'oxygène consommé est associé à la production d'ERO par fuite d'électron [76].

Les effets de ces espèces radicalaires sont bénéfiques, microbicides, mais aussi majoritairement délétères : oxydation des acides aminés, blocage de la chaîne respiratoire...

Le peroxy-nitrite provient, quant à lui, plus spécifiquement de la réaction spontanée du NO avec l' $\text{O}_2^-$ . Le peroxy-nitrite présente des actions à la fois physiologiques et physiopathologiques. En effet, cette molécule permet la nitration de la tyrosine interférant par exemple avec les processus de phosphorylation de la tyrosine, ce qui entraîne une régulation des cascades de transduction du signal (protéine kinase B, MAPK,...) [77]. La nitration des lipides, conséquence de la formation de radicaux libres à partir du peroxy-nitrite, peut aussi avoir une action de signalisation anti-inflammatoire par une régulation négative du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ou la transcription des gènes PPAR $\gamma$ . Néanmoins, c'est surtout en situation pathologique telle que durant le choc septique, que les effets délétères des peroxy-nitrites se démasquent.

Ces effets pathologiques du peroxy-nitrites sont résumés dans la figure 4.

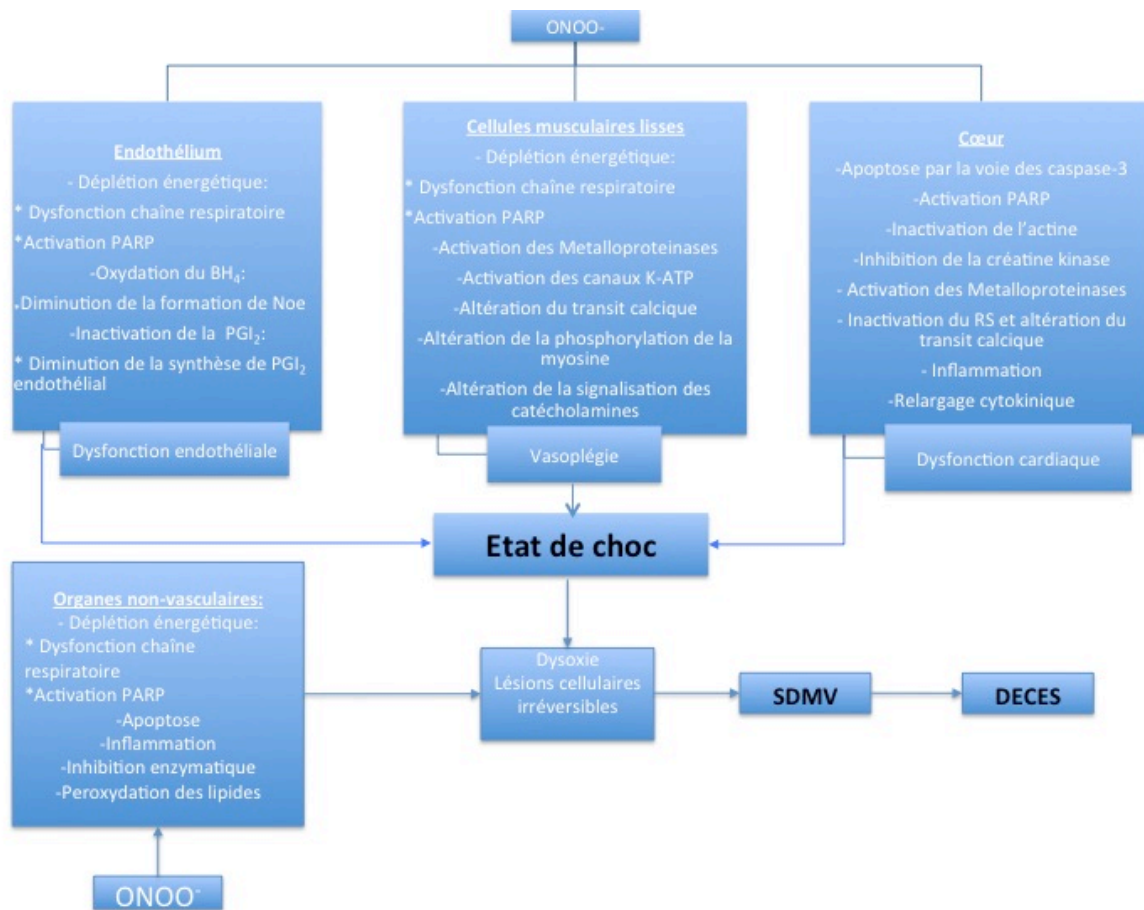


Figure 4 : Effets physiopathologiques du peroxy-nitrite dans l'état de choc septique. SDMV : Syndrome de défaillance multiviscérale. BH4 : Tétrahydrobioptérine, PGI<sub>2</sub> : Prostacycline. PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase. RS : Réticulum Sarcoplasmique.

### Eicosanoïdes

Les eicosanoïdes proviennent de l'oxydation de l'acide arachidonique, acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone, par la phospholipase A2 à partir des phospholipides membranaires [78]. Les eicosanoïdes sont le plus souvent associés à l'inflammation mais ils ont aussi des fonctions essentielles dans l'homéostasie de la coagulation, la vasodilatation... En situation de stress inflammatoire comme durant le choc septique, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 ou le TNF $\alpha$  vont entraîner une augmentation de la synthèse de phospholipase A2. Identiquement, ce même processus inflammatoire va aussi induire une augmentation de la synthèse d'un second

groupe d'enzymes, dont la cyclooxygénase, les lipooxygénases 5, 8, 12, 15 et les enzymes du groupe du cytochrome P450.

Chaque médiateur qui est produit à partir des enzymes suscités a une action physiologique spécifique. Les plus connus dans le choc septique, qui dérivent de l'action de la cyclo-oxygénase et font partie du groupe des prostanoides, sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Rôle physiologique des eicosanoïdes adapté de [78]

Enzyme	Médiateur	Récepteurs	Effets physiologiques	Références
Cyclooxygénase	PGE <sub>2</sub>	EP1, EP2, EP3, EP4	Vasodilatation, fuite capillaire, fièvre, synthèse d'IL10, Diminution synthèse de TNF	[79-82]
	PGI <sub>2</sub>	IP	Diminution de l'agrégation plaquettaire, vasodilatation, Augmentation de la synthèse d'IL10, diminution de la synthèse de TNF	[80, 83, 84]
	TXA <sub>2</sub>	TP	Augmentation de l'agrégation plaquettaire, vasoconstriction, diminution de activation ces cellules lymphocytaires T	[85-87]

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E2, EP : Récepteur PGE, PGI<sub>2</sub> : Prostacycline, IP : Récepteur PGI, TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A2, TP: Récepteur du Thromboxane.

Si les effets physiologiques des eicosanoïdes sont bien décrits dans la littérature, les implications thérapeutiques pour l'amélioration de la prise en charge du choc septique sont tout à fait décevantes. Ainsi l'inhibition de la cyclooxygénase par l'ibuprofène chez le patient en choc septique en comparaison avec un placebo n'est associée à aucune amélioration de l'hémodynamique et comporte une tendance à la dégradation de la fonction rénale [88].

### *Dysfonction de la coagulation*

Il existe une relation étroite entre la surexpression inflammatoire et le dysfonctionnement entre la balance pro- et anti-coagulante durant le choc septique.

En pratique clinique, les anomalies de la coagulation durant le choc septique couvrent un large spectre qui s'étend d'une modeste thrombopénie de consommation jusque dans sa forme la plus extrême à la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Cette dernière forme associe cliniquement des microthrombus étendus à tout le réseau capillaire et des symptômes hémorragiques diffus spontanés.

Sa définition, consensuelle, repose sur un faisceau d'arguments biologiques qui comprennent :

- 1) une réduction du compte plaquettaire  $< 50$  G/l dans 50% des cas ou une chute de 50% de la valeur initiale même si le compte reste dans les limites de la normale ;
- 2) un allongement du temps de prothrombine (TP) et du temps de céphaline activé (TCA) qui est retrouvé dans près de 60% des cas. Un TP et un TCA normal à la phase initial peuvent seulement signifier une augmentation de la production de facteurs de la coagulation conjointement à une augmentation de la consommation et par conséquent ne peuvent exclure le diagnostic ;
- 3) un taux de fibrinogène bas n'est retrouvé que rarement et tardivement dans 28% des cas et un taux normal n'exclue pas le diagnostic de CIVD ;
- 4) La présence de produit de dégradation de la fibrine et de D-dimères témoigne en parallèle de l'accélération de la génération de thrombine et d'une augmentation de la fibrinolyse. Les D-dimères seuls sont augmentés par de multiples conditions (traumatisme, hémorragie, thrombose) et ne sont pas synonymes de CIVD. Les monomères de fibrines sont relativement plus spécifiques tout en étant plus sensibles.

Pour aider le clinicien, l'International Society on Thrombosis and Haemostasis a développé un score numérique pour orienter le diagnostic de CIVD [89]. Certains tests plus spécifiques sont actuellement en cours d'évaluation, comme la mesure de l'antithrombine III, de la protéine C, de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire...[90]

Physiopathologiquement, les mécanismes qui concourent à l'activation de la coagulation durant le choc septique sont relativement bien définis. Durant le choc septique, l'immunité innée active l'inflammation comme décrit dans les chapitres précédents.

L'inflammation active la coagulation principalement par trois mécanismes :

- augmentation de l'expression du facteur tissulaire [91] ;
- inhibition du système de la protéine C [92] ;
- inhibition de la fibrinolyse [93].

Nous détaillerons sans être exhaustifs ces trois mécanismes.

#### Augmentation de l'expression du facteur tissulaire

Le facteur tissulaire est une glycoprotéine transmembranaire qui est à l'origine de l'activation de la cascade de la coagulation en cas de lésion vasculaire traumatique, infectieuse, inflammatoire (figure 5).

Dans le cadre d'un stimulus inflammatoire, la principale cytokine qui entraîne une augmentation de l'expression du facteur tissulaire est l'IL6. Ainsi l'inhibition d'IL6 permet-elle de bloquer la génération de thrombine dans un modèle endotoxinique chez le chimpanzé [94]. D'autres médiateurs de l'inflammation majorent par d'autres voies l'expression du facteur tissulaire et en particulier le  $TNF\alpha$ , IL1 et IL12. Le facteur tissulaire constitutionnel est quant à lui exprimé par le sous-endothélium mis à nu par l'agression inflammatoire ou infectieuse. Les autres cellules exprimant le facteur tissulaire étant les monocytes circulants et les cellules endothéliales [95]. Un des mécanismes à l'origine de la dissémination du processus pro-coagulant trouve

probablement son origine dans la production de microparticules porteuses du facteur tissulaire à partir des monocytes essentiellement [96].

#### Inhibition du système de la protéine C

La voie de la protéine C a de multiples actions anti-coagulantes et anti-inflammatoires. Elle agit comme un rétrocontrôle négatif lors de la génération de thrombine. Le principal acteur est la forme activée de la protéine C qui est une enzyme protéolytique qui clive les facteurs Va et VIIIa permettant la réduction de la génération de thrombine et donc la réduction de la formation de fibrine.

Pour se figurer l'impact de ce mécanisme de régulation anti-coagulant, le processus d'activation de la protéine C est amplifié d'un facteur 1000 lorsque la thrombine se fixe sur son récepteur : la thrombomoduline, et d'un facteur 10 à 20 lorsque la protéine C se lie à son récepteur endothélial : le récepteur à la protéine C [97].

Le choc septique modifie cette voie de régulation. En effet, durant le processus septique, l'activation de la voie de la protéine C est diminuée et ce d'autant plus que l'âge est avancé [98]. Cette diminution de la présence de protéine C activée peut s'expliquer expérimentalement par un défaut de production et/ ou une augmentation de consommation. Il semble néanmoins probable que durant le choc endotoxinique, en particulier sur des animaux âgés, le niveau d'expression de la thrombomoduline soit diminué [99]. D'autres mécanismes interviennent par ailleurs comme la diminution de l'expression du récepteur à la protéine C.

L'activation de la voie de la protéine C activé a aussi des effets anti-inflammatoires *via* les différents récepteurs PAR (Protease Activated Receptor 1 à 4) qui participent entre autres à majorer la perméabilité vasculaire ou à diminuer l'intégrité endothéliale [100]. Néanmoins, les conséquences thérapeutiques chez l'homme, initialement prometteuses, sont aujourd'hui nulles [6, 7].

## Inhibition de la fibrinolyse

La défaillance du système fibrinolytique joue un rôle fondamental dans la formation et la dissémination des microthrombus intravasculaires et favorise l'évolution vers la défaillance multi-organes [101].

Physiologiquement, la dégradation du caillot de fibrine est sous le contrôle de la plasmine qui est produite à partir du plasminogène, forme zymogène de la plasmine.

Les mécanismes régulateurs principaux sont au nombre de deux :

- **Activateur** : L'activation fait suite à une série de réactions enzymatiques connues sous le nom d'activateurs du plasminogène (PA) [102]. On retrouve dans cette classe enzymatique le tissu-type plasminogène activator (t-PA), l'urokinase-type plasminogène activateur (u-PA).
- **Inhibiteur** : Ce système est inhibé principalement par:
  - o 1) le Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) qui se lie au t-PA et à l'u-PA ;
  - o 2) l' $\alpha$ 2-antiplasmin qui se lie à la plasmine ;
  - o 3) le Thrombin-Activatable Fibrinolysis Activator (TAFI), indispensable dans la stabilisation du caillot en empêchant l'action de la plasmine [103].

Durant le choc septique, la synthèse de TAFI est fortement augmentée par le complexe thrombine-thrombomoduline. Cette synthèse se réalise beaucoup plus rapidement que l'activation de la voie de la protéine C. En conséquence, à de faibles concentrations de thrombomoduline, il existe un déséquilibre pro-coagulant entre la quantité produite de TAFI et celle de protéine C activée [104, 105]. Même si la fibrinolyse est activée de façon majeure durant le sepsis, l'excès d'inflammation entraîne aussi une augmentation de production de PAI-1 qui va participer à l'inhibition partielle de la voie de dégradation de la fibrine. Il a été ainsi montré dans plusieurs travaux que le niveau d'expression de PAI-1 était plus élevé chez les non-survivants que chez les survivants [106-108].

D'autres mécanismes sont impliqués dans la dérégulation de la coagulation et de l'évolution vers le syndrome de coagulation intravasculaire disséminée. En particulier, il existe une interrelation étroite entre inflammation, coagulation et eicosanoïdes, comme, par exemple, avec le thromboxane A2, dont la synthèse augmente le niveau d'expression du facteur tissulaire [109].

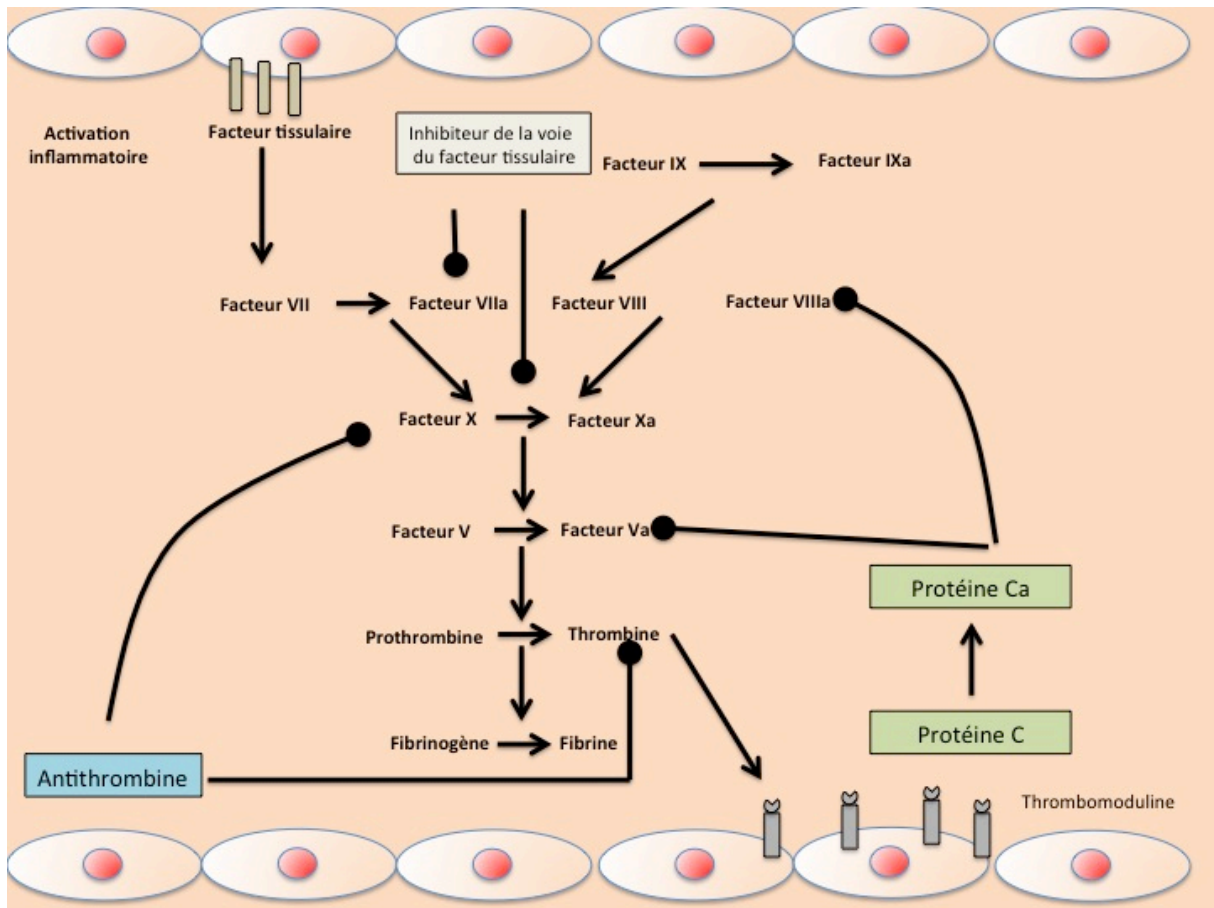


Figure 5: Schéma simplifié de la cascade de la coagulation adapté de [110]. L'expression du facteur tissulaire est augmentée par le stress inflammatoire. Il entraîne le déclenchement de la cascade de la coagulation qui aboutit à la génération de thrombine. Les mécanismes régulateurs impliqués sont l'antithrombine, qui bloque l'activation des facteurs XII, XI IX et X, et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire qui interfère directement avec le complexe facteur tissulaire et facteur VIIa. Les ronds noirs symbolisent un effet inhibiteur.



### *Dysfonction neuro-hormonale de l'axe corticotrope (annexe 1)*

Principalement représenté par l'atteinte de l'axe corticotrope, ce chapitre fait l'objet d'une monographie complète fournie en annexe 1 [111].

Indépendamment de l'axe corticotrope sur lequel la littérature est la plus abondante, la thyroïde, l'hormone de croissance, la vasopressine sont aussi des axes altérés durant le choc septique.

### *Dysfonction mitochondriale*

Arguments cliniques pour une dysfonction mitochondriale durant le choc septique

L'évolution éventuelle vers la défaillance multi-organes peut être en partie expliquée par les troubles de l'utilisation de l'oxygène qui se développent durant l'état de choc. Ces troubles de l'utilisation de l'oxygène ont été découverts à partir de plusieurs études observationnelles qui montrent que durant le choc septique :

- La consommation en oxygène diminue avec la gravité du sepsis [112] ;
- La pression en oxygène est haute dans le muscle initialement et se normalise lors de la phase de guérison [113] ;
- Il y a peu d'apoptose et de nécrose durant le processus septique au niveau des organes dysfonctionnant [114] ;
- Les organes avec peu de capacités régénératrices guérissent sans séquelles (exemple : le rein) [115].

Ce faisceau d'arguments converge vers une dysfonction de la mitochondrie et plus spécifiquement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### *Physiologie*

La physiologie de la chaîne respiratoire mitochondriale est décrite de façon schématique dans la figure 6.

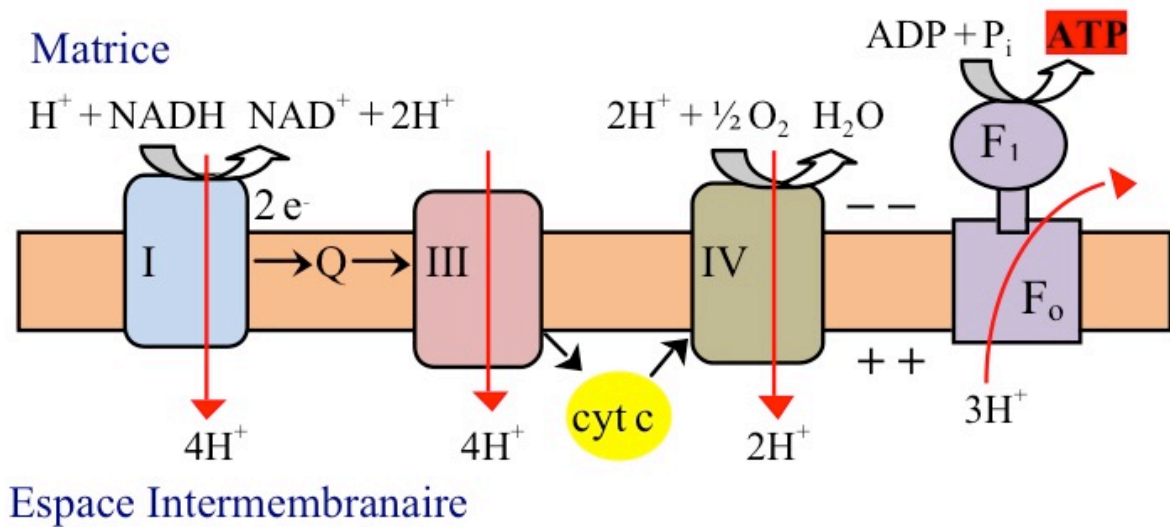


Figure 6 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie. Pour simplifier l'ensemble, le complexe II n'est pas inclus. Le cycle de Krebs fournit le  $NADH + H^+$  qui va être oxydé par la chaîne respiratoire en fournissant des électrons et des protons. Les électrons vont être transportés dans l'espace intermembranaire par le cytochrome c (cyt c) et le coenzyme Q (Q). Les enzymes de la chaîne respiratoire de transport des électrons utilisent l'énergie libérée par le  $NADH$  pour aspirer les protons de la matrice vers l'espace inter membranaire, créant ainsi un gradient de pH entre ces deux espaces. Le potentiel créé est une source d'énergie qui est ensuite utilisée par l'ATP synthase (Complexe V) pour phosphoryler l'ADP en ATP. L'ensemble de la réaction à partir d'une molécule de glucose produit 36 molécules d'ATP.

Le stress oxydatif à l'origine de la dysfonction de la chaîne respiratoire durant le choc septique

La physiopathologie de la dysfonction mitochondriale durant le choc septique est liée d'une part à l'augmentation du stress oxydatif et d'autre part à la déplétion des molécules antioxydantes.

Comme précisé dans les chapitres précédents, les principales espèces radicalaires dérivées de l'oxygène sont l'anion super oxyde ( $O_2^-$ ) et le radical Hydroxyl ( $OH\bullet$ ). La production de ces espèces est la conséquence physiologique de la fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Normalement, seulement 2% de l'oxygène consommé est converti en  $O_2^-$ . Dans ce cadre, les lésions mitochondriales éventuelles pouvant être induites par l' $O_2^-$  sont prévenues par l'action de l'enzyme superoxyde dismutase qui est présente au sein de la mitochondrie. Identiquement, le NO produit en quantité physiologique nanomolaire inhibe de façon réversible l'enzyme cytochrome oxydase et agit donc comme un régulateur de la chaîne respiratoire [116].

Nous nous limiterons à présenter brièvement les effets du monoxyde d'azote et de ses dérivés sur la chaîne respiratoire.

Durant l'état de choc septique, la production de monoxyde d'azote est augmentée de façon majeure, ce qui entraîne au niveau de la chaîne respiratoire :

- 1) une inhibition directe rapide et réversible de l'activité enzymatique des cytochromes oxydases ;
- 2) la production d'espèce réactive de l'azote incluant le peroxydazote, le S-nitrosothiole, le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) et le tri-oxyde d'azote ( $N_2O_3$ ) qui vont avoir une action lente, sélective mais irréversible d'inhibition de la respiration oxydative mitochondriale [117].

Ainsi, pour exemple, dans un modèle expérimental *ex vivo* d'aorte chez le rat, le monoxyde d'azote produit en quantité importante suite à l'augmentation de l'expression de la NO synthase inductible en association avec une hypoxie modérée entraîne une

nécrose du tissu aortique dont l'imputabilité est liée à une inhibition du complexe IV [118]. Dans un autre modèle expérimental *ex vivo*, la S-nitrosation du complexe I entraîne son inhibition et explique en partie l'augmentation de la production d'anion superoxyde [119]. Enfin, le peroxyntrite va inhiber plusieurs composants de la chaîne respiratoire tels que les complexes I, II et V [120, 121].

Les principaux sites d'action du monoxyde d'azote et des espèces réactives de l'azote sont présentés dans la figure 7.

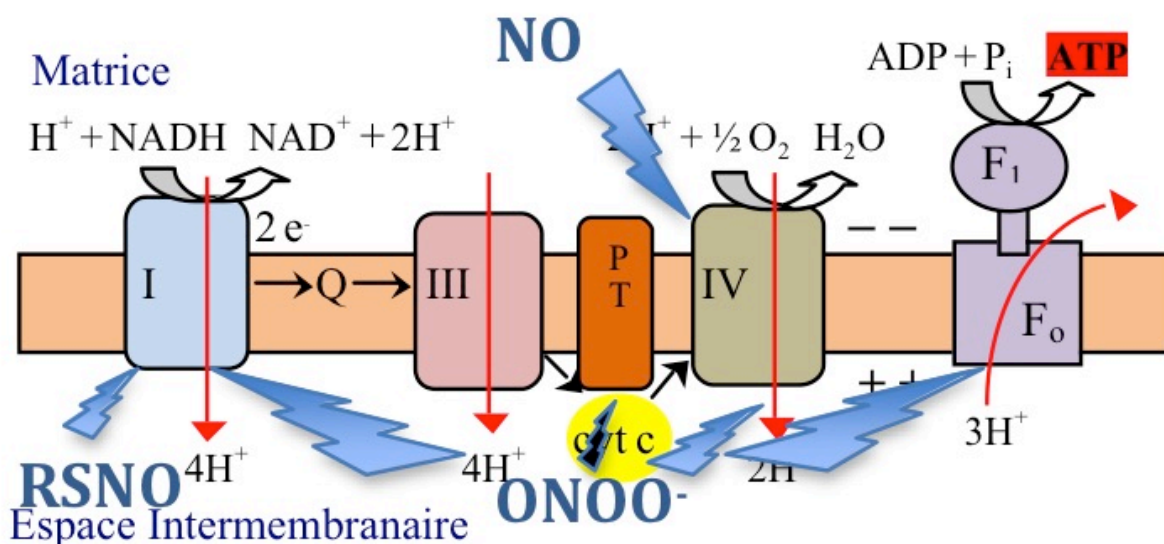


Figure 7 : Représentation schématique des principaux sites d'action du monoxyde d'azote (NO), du peroxyntrite (ONOO<sup>-</sup>) et du nitrosothiole (RSNO) sur la chaîne respiratoire adaptée de [122]. Le NO va agir de façon spécifique et réversible sur le cytochrome oxydase (complexe IV), le nitrosothiole inactive le complexe I, tandis que le peroxyntrite inhibe plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mais aussi l'aconitase

et l'enzyme superoxyde dismutase (non représenté) (éclair bleu). A l'inverse, le peroxydrite active le pore de transition mitochondriale (éclair noir).

### Mécanismes endogènes protecteurs

Pour maintenir l'homéostasie de la balance redox au niveau de la mitochondrie, l'accumulation des ERO et des ERA est inhibée ou retardée par la production de molécules anti-oxydantes. De façon similaire aux TLRs, les antioxydants sont des molécules extrêmement conservées dont l'action peut être de type enzymatique ou non enzymatique, de provenance endogène ou exogène [123]. Parmi les molécules enzymatiques, on retiendra la Superoxyde Dismutase (SOD), la glutathione peroxydase, la catalase et la thiorédoxine. Les molécules non-enzymatiques sont habituellement représentées par les vitamines A, C et E, le cuivre, le sélénium et certains acides aminés.

### Réalité clinique de la dysfonction mitochondriale septique

Les données scientifiques s'accumulent pour confirmer le rôle essentiel de la dysfonction mitochondriale dans l'évolution du choc septique vers la défaillance multi-organes. Un travail clinique portant sur la morphologie mitochondriale et la fonctionnalité de la chaîne respiratoire a été réalisé à partir de biopsies musculaires de 16 patients en choc septique comparées à celles de 10 patients volontaires sains. Les résultats principaux étaient, chez les patients septiques comparés aux volontaires sains, une augmentation du volume des mitochondries et une diminution de l'activité des complexes I et IV. Cette diminution tendait à être plus importante chez les patients non-survivants. Le renouvellement des protéines mitochondriales était 2,5 fois plus important chez les survivants que chez les non-survivants. Finalement la production d'ATP était significativement supérieure chez les patients survivants comparés aux patients non-survivants [124].

Dans le syndrome de défaillance multi-organes, les défaillances cardiaque et vasculaire tiennent une place particulière. D'une part, elles sont intriquées l'une à l'autre, et d'autre part, elles sont souvent à l'origine des défaillances des autres organes.

## **Impact de l'acidose lactique dans la défaillance cardiovasculaire de l'état de choc.**

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2015 fournie *in extenso* en annexe 3 [125].

## **Cœur et sepsis**

### **Rappel sur la physiologie de la contraction et la relaxation myocardique**

#### **Structures impliquées (Figure 8)**

Le myocarde ventriculaire est constitué essentiellement de myocytes, de tissu interstitiel et de vaisseaux. Le cardiomyocyte est l'élément cellulaire prédominant quantitativement (75 % du volume myocardique) et se compose de différentes structures spécifiques.

Le sarcomère, unité fonctionnelle contractile de la cellule cardiaque, est constitué de myofibrilles. Ces dernières comportent des bandes claires (Isotropes) et sombres (Anisotropes). Deux disques (bande **Z**) bordent le sarcomère. La myosine constituant les filaments épais se situe dans la partie centrale du sarcomère s'imbriquant avec les filaments fins d'actine accrochés aux disques **Z**. Le maintien de cet ensemble est assuré par des protéines de structure (vinculine, intégrine...) [126]. Les myofibrilles sont elles-mêmes entourées par les filaments intermédiaires du cytosquelette assurant la cohésion de la structure dans la cellule.

La myosine est une protéine de haut poids moléculaire (520 kDa) capable de catalyser l'ATP. Elle comporte deux chaînes lourdes et deux paires de chaînes légères.

Les chaînes légères jouent un rôle direct dans la mobilité des têtes de myosines mais pas dans l'hydrolyse de l'ATP.

La structure de l'actine comporte deux brins enroulés en double hélice. Les monomères d'actine G sont reliés entre eux par des liaisons non-covalentes fortes. Ils constituent chacun des deux brins. Ces mêmes monomères présentent des sites de liaison pour des cations divalents, comme le calcium ou le magnésium, pour l'ATP et deux sites pour les têtes de myosine (un de forte et un de faible affinité).

La tropomyosine est constituée de deux filaments protéiques formant une double hélice  $\alpha$ . La modification de sa position au sein de la gorge de la double hélice d'actine permet de masquer ou de démasquer les sites de fixation de forte affinité pour la myosine [127].

Les troponines constituent un hétérotrimère comportant la troponine C (TnC), la T (TnT) et la I (TnI). La TnC possède trois sites de liaisons dont un spécifique du calcium (d'où son nom C). La TnI présente de multiples sites de contact avec la TnC, la TnT, et la tropomyosine. Son activité est essentiellement inhibitrice. La TnT est une protéine de liaison entre les deux autres formes de troponines et la tropomyosine.

Le sarcolemme correspond à la bicouche phospholipidique de la plupart des membranes cellulaires. Cependant la présence d'invaginations (tubules T ou système tubulaire transverse) en son sein est une particularité de ce type cellulaire qui augmente de façon significative sa surface d'échange, améliorant la diffusion d'oxygène, des nutriments et la transmission du potentiel d'action. Principalement présents au sein du ventricule, ces tubules T sont absents des oreillettes. Plusieurs complexes protéiques transmembranaires au sein de ces invaginations sont impliqués dans la contraction - relaxation et participent à la régulation de la concentration calcique intracellulaire.

Enfin, le réticulum sarcoplasmique est la réserve intracellulaire en calcium facilement mobilisable. Il s'agit d'une structure formée d'un réseau de tubules entourant les myofibrilles et en contact avec le sarcolemme (dyades, zones de proximité entre les

tubules T et le réticulum sarcoplasmique). Anatomiquement en face des bandes anisotropes, il forme un réseau anastomosé riche tandis qu'entre les bandes anisotropes et les disques Z, il s'organise en réseau tubulaire longitudinal. Ce réticulum sarcoplasmique est impliqué dans la recapture du calcium durant la phase de relaxation.

Trois types protéiques sont impliqués dans le couplage contraction – relaxation :

- la  $\text{Ca}^{++}$  ATPase (SERCA, sarcoplasmic réticulum  $\text{Ca}^{++}$  ATPase), fait rentrer deux ions calcium contre le gradient de concentration, dont l'activité est régulée par la phosphorylation d'une protéine membranaire, le phospholamban [128] ;
- la calséquestrine qui fixe le  $\text{Ca}^{++}$  et qui est localisée à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique [129] ;
- les récepteurs à la ryanodine (RyR) qui correspondent aux canaux de relargage du calcium durant la contraction [130].

Enfin, il est difficile de ne pas impliquer la relation étroite entre les mitochondries et le complexe contractile participant à l'approvisionnement en molécules de hautes énergies comme l'ATP.



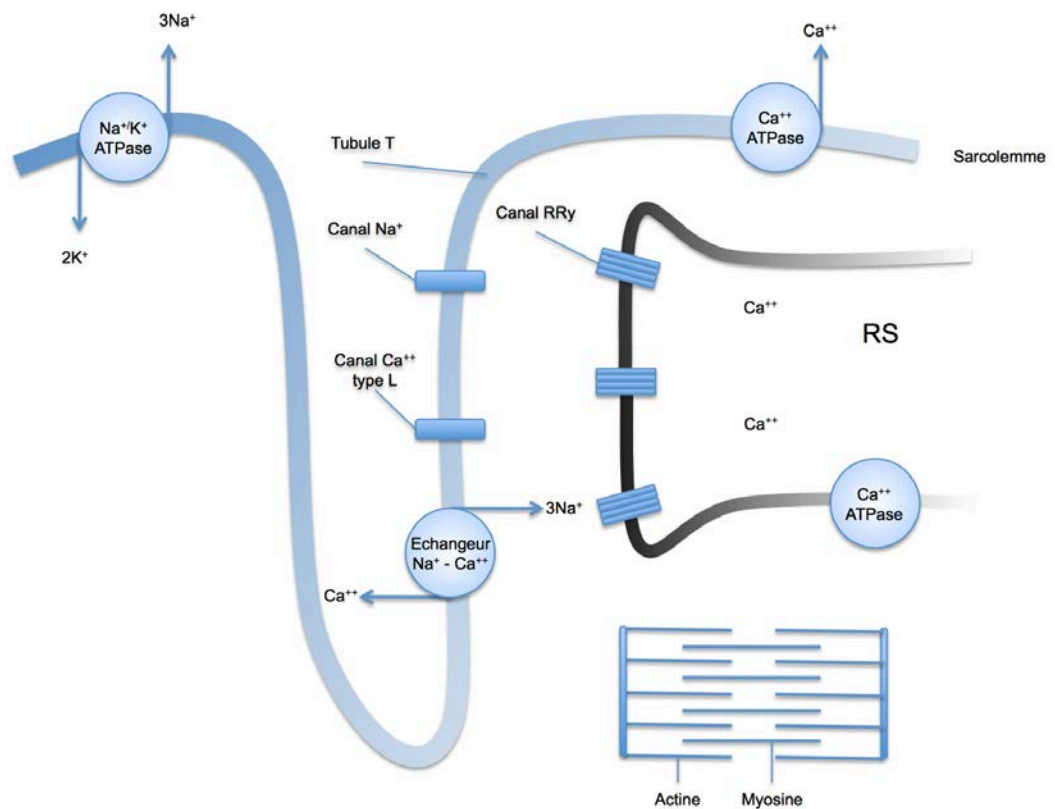


Figure 8: Schéma simplifié des principales structures impliquées dans la contraction de la cellule musculaire striée myocardique d'après [131]. RS : Réticulum Sarcoplasmique, RyR : Récepteur à la Ryanodine.

### Couplage excitation - contraction

#### *Transit calcique*

Le phénomène contractile est lié à la stimulation de protéines impliquées dans la contraction, activées par le calcium. Le signal de contraction est déclenché par la propagation du potentiel d'action. La dépolarisation induit une entrée de sodium par les canaux sodiques voltages dépendants conduisant à l'ouverture des canaux calciques (type L) et à l'entrée de calcium dans la cellule. Cette entrée de calcium est insuffisante pour entraîner la contraction du myocyte qui n'interviendra qu'après la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (calcium induced, calcium release). Le calcium libéré se fixera sur la troponine C entraînant une modification conformationnelle du complexe troponine tropomyosine et ainsi la formation de pont actine - myosine.

### Calcium induced - Calcium release (Figure 9)

La régulation du phénomène « Calcium induced - Calcium release » passe par l'activation des récepteurs à la ryanodine et les canaux calciques de type L. Cette modulation peut être assimilée schématiquement à une synapse calcique ou le canal calcique de type L active un récepteur ou un groupe de récepteurs à la ryanodine (cluster). La visualisation en microscopie confocale des variations de calcium intracellulaire au niveau des micro-espaces « inter synaptiques » apparaît sous la forme d'étincelles ou sparks. Il est maintenant démontré que la quantité de sparks est liée au nombre de canaux calciques de type L activés et que la vitesse et la quantité de calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique dépend du nombre de sparks. Ainsi, la régulation du relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique est étroitement liée à l'intensité et à la durée du courant calcique de type L [132].

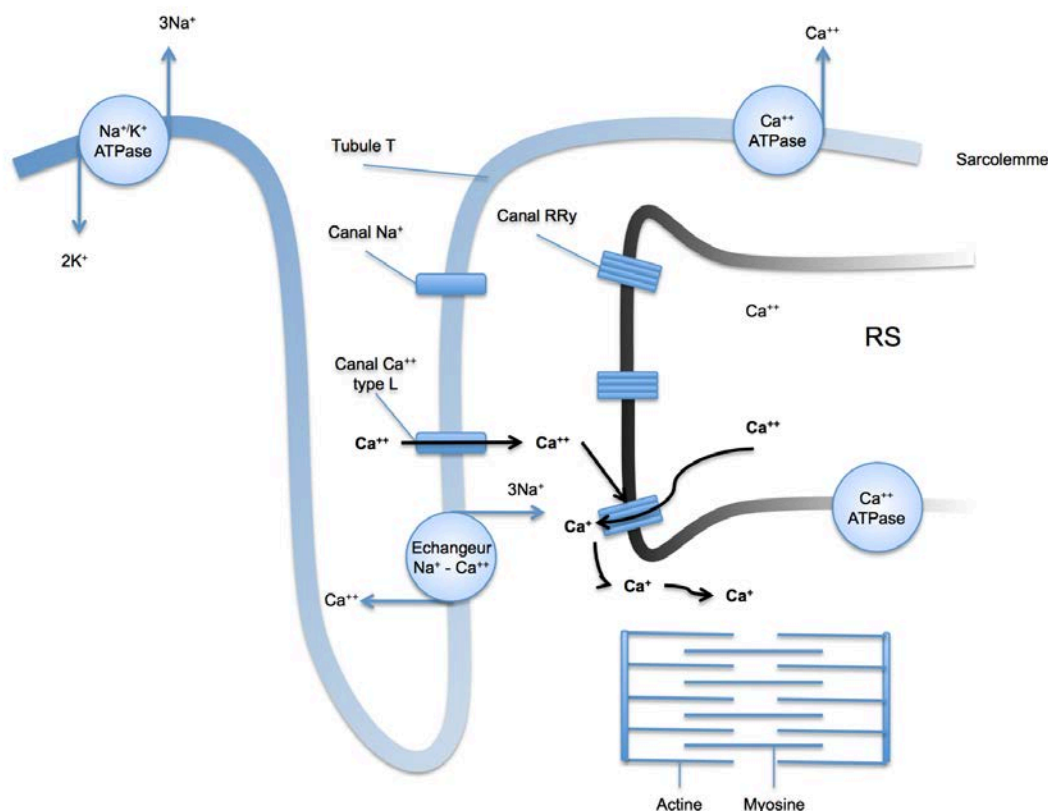


Figure 9 : Schéma simplifié de la contraction au niveau d'une cellule musculaire striée cardiaque d'après [131]. RS : Réticulum Sarcoplasmique, RyR : Récepteur à la Ryanodine.

### *Les ponts actine – myosine*

Au repos, à faible concentration intracellulaire de calcium, les sites de liaison de l'actine pour la myosine sont bloqués par la tropomyosine. La formation de ponts à type de liaisons non-covalentes fortes est impossible. Cependant, il existe des liaisons faibles actine–myosine sans aucune implication contractile, mais qui permettent probablement une structure de repos stable.

L'apparition de ponts actine – myosine est le résultat d'une série de modifications conformationnelles impliquant le complexe troponine–tropomyosine. Les sites de fixation de l'actine à la myosine étant ainsi découverts autorisent la formation des ponts. Schématiquement, le calcium se fixe à l'extrémité N terminale de la troponine C, permettant un déplacement de la troponine I qui renforce sa liaison à la troponine C. Ce mouvement de la troponine I entraîne deux phénomènes :

- un mouvement global du complexe troponine T–tropomyosine ;
- la libération du site couvert par l'interaction troponine I–actine.

Ces nombreuses modifications autorisent la formation du cycle des ponts actine–myosine en libérant les sites d'interactions entre la myosine et l'actine.

La contraction est l'aboutissement de la formation cyclique de ponts actine – myosine avec hydrolyse d'ATP. La force (nombre de ponts actine – myosine et la force exercée par chaque pont) est indépendante de la quantité d'ATP alors que la durée et la vitesse de raccourcissement sont directement liées à la quantité d'ATP présente.

Un cycle de pont actine – myosine comprend [133] :

- fixation de l'actine à la myosine ;
- flexion de la tête de myosine ;
- le glissement du filament d'actine le long du filament épais de myosine ;
- détachement alors de la tête de myosine qui revient à sa position initiale pour un nouveau cycle.

### *Le phénomène de coopération*

La fixation du calcium sur la troponine C déclenche l'activation des ponts actine - myosine. Les différentes modifications induites par la formation des ponts exercent un rétrocontrôle positif sur l'activité de ces mêmes myofilaments, permettant ainsi un gain d'énergie non négligeable. La coopération s'exerce ainsi à deux niveaux :

- un seul complexe troponine - tropomyosine permet le contrôle de 14 molécules d'actine ;
- la formation des ponts actine - myosine en état de liaison forte induit une augmentation de l'affinité de la troponine pour le calcium.

### **Relaxation (figure 10)**

Le retour du muscle à un état basal de tension et de longueur correspond à la relaxation. Ce processus est actif et consomme de l'énergie. Il a en effet pour objectif de ramener les concentrations de calcium intracellulaire à leur valeur initiale grâce à la  $\text{Ca}^{++}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA). La dissociation des ponts actine-myosine dépend de trois facteurs indépendants :

- la dissociation du calcium de la troponine C ;
- la diminution de la concentration de calcium intracellulaire ;
- les contraintes mécaniques extrinsèques et intrinsèques.

La diminution du calcium intracellulaire est le résultat de l'activation de SERCA, de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , et plus modestement de la  $\text{Ca}^{++}$  ATPase du sarcolemme [128]. Les forces élastiques internes liées à la compression du sarcomère limitent la contraction et favorisent donc la relaxation. L'étirement du cytosquelette et du sarcolemme, représentant les forces élastiques externes, tendent à ramener la cellule à son état basal. Indirectement, la recapture du calcium par SERCA dans le réticulum sarcoplasmique est liée à la déphosphorylation du phospholamban. Ce dernier à l'état déphosphorylé est

donc inactif. Sa phosphorylation dépend de protéines kinases activées par le calcium et par les agonistes  $\beta$  adrénergiques.

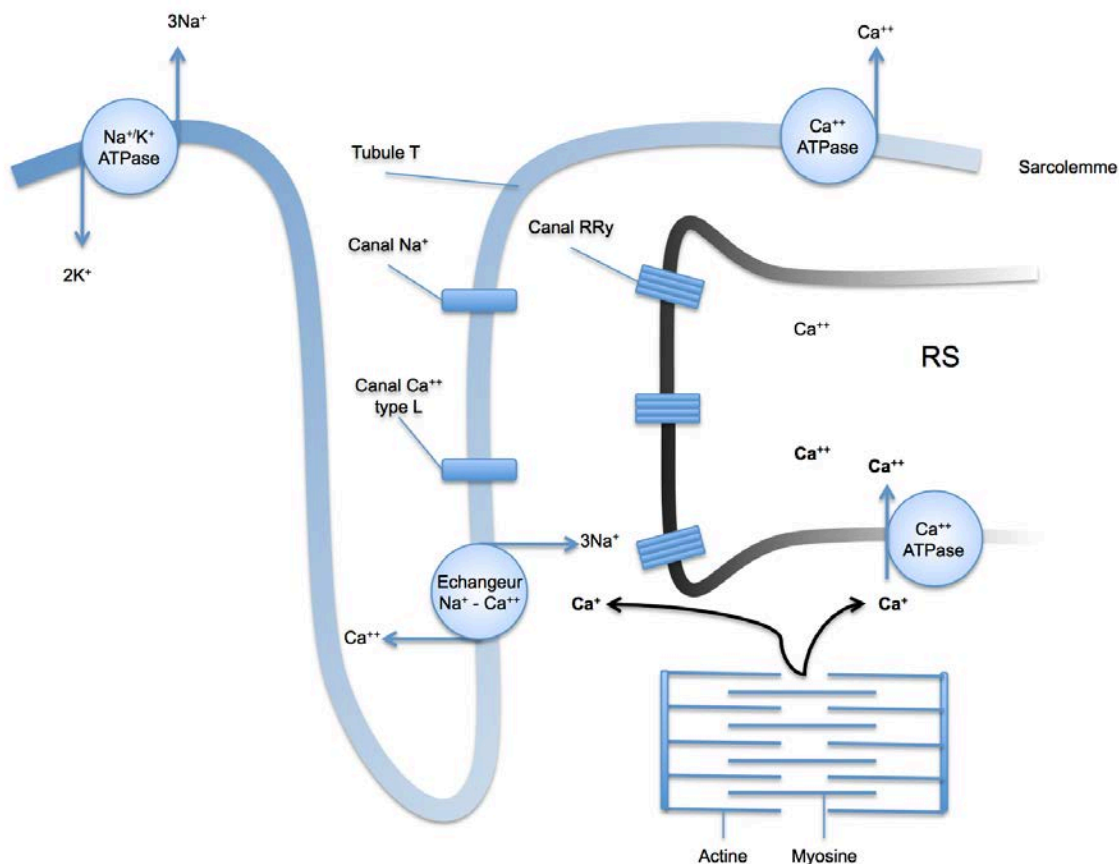


Figure 10 : Schéma simplifié de la relaxation de la cellule musculaire myocardique d'après [131]. RS : Réticulum Sarcoplasmique, RyR : Récepteur à la Ryanodine.

## Physiopathologie de la dysfonction cardiaque durant le sepsis

### Historique

Les premières descriptions de la dysfonction cardiaque septique remontent à 1984. Dans le travail de Parker *et al.*, les auteurs réalisaient, chez 20 patients en choc septique, une évaluation de la fonction cardiaque par l'enregistrement cinématique de ventriculogrammes avec injection, à l'époque, d'un radionucléide. Si tous les patients présentaient un débit cardiaque élevé, une dysfonction cardiaque était enregistrée chez 50% des patients avec une FeVG < 40%. Treize malades survivaient et 10/13

présentaient une dysfonction cardiaque initiale. Tous les survivants récupéraient une fonction cardiaque dans les sept jours qui suivaient [134].

## Caractérisation hémodynamique de la cardiomyopathie septique

### Clinique

Trente ans plus tard, cette première description reste tout à fait valide même si la cinétique clinique s'est affinée.

### Fonction systolique ventriculaire gauche

A la phase initiale du choc septique, chez les patients indemnes de cardiopathie sous-jacente et afin de répondre à la demande tissulaire en oxygène, il est fréquemment observé une augmentation du débit cardiaque. Cette augmentation, associée à une fraction d'éjection généralement élevée, est la conséquence de la diminution de la post-charge ventriculaire gauche *via* la diminution des résistances vasculaires et masque artificiellement le plus souvent une dysfonction cardiaque inotropique sous-jacente. Certains travaux suggèrent qu'à la phase initiale du choc septique, l'intensité de cette hyperkinésie à haut débit est associée d'une part à la gravité de la dysfonction myocardique sous-jacente et d'autre part à la profondeur de la vasoplégie [135-137].

Secondairement, dans les 48 à 72 heures qui suivent le diagnostic du choc septique, lors de la normalisation sous vasopresseurs des résistances vasculaires, la cardiomyopathie se démasque sous sa forme hypokinétique [138]. Dans un travail prospectif observationnel réalisé dans notre service, nous avons inclus 70 patients en choc septique. L'objectif était d'évaluer la valeur pronostique de l'évolution spontanée de la réserve cardiaque entre J1 et J2 suivant le début de ce choc. Les marqueurs de la réserve étaient l'Index de Puissance Cardiaque ( $IPC = \text{Index Cardiaque} * \text{Pression Artérielle Moyenne} / 451$ ) et le Double Produit ( $DP = \text{Fréquence Cardiaque} * \text{Pression Artérielle Systolique}$ ). Nous avons également constaté que les patients non-survivants

présentaient à la phase initiale un débit cardiaque plus élevé et qu'une évolution négative de l'IPC et du DP était fortement associée au décès [139] (annexe 2).

Plusieurs autres travaux cliniques chez les patients en choc septique à la phase initiale ont par ailleurs confirmé que l'amélioration du débit cardiaque après l'adjonction d'un inotrope tel que la dobutamine était associée à un meilleur pronostic [140-142].

Ainsi, la fraction d'éjection ventriculaire gauche, loin de refléter uniquement la contractilité intrinsèque du muscle cardiaque, est aussi grandement influencée par la pré- et, particulièrement en contexte septique, par la post-charge [143]. La contractilité intrinsèque ventriculaire gauche durant le choc septique est par conséquent très difficile à appréhender et les tests dynamiques par adjonction d'inotropes sont probablement utiles au clinicien pour le guider dans son appréhension de l'état hémodynamique.

#### Fonction diastolique ventriculaire gauche

La dilatation ventriculaire gauche est fréquemment retrouvée dans les études d'évaluation de la cardiomyopathie septique. Parker *et al.* ont décrit en 1984 une augmentation du volume ventriculaire qu'ils ont considérée comme étant un mécanisme adaptatif compensant la baisse de l'inotropisme et donc de débit cardiaque par une augmentation du volume ventriculaire selon la loi de Starling. Cette dilatation ventriculaire est effectivement retrouvée chez les patients présentant une dysfonction systolique [144]. Même si le volume ventriculaire gauche est augmenté chez ces patients présentant une dysfonction systolique gauche comparativement à ceux qui n'en présentent pas, les dimensions ventriculaires gauches restent le plus souvent dans les limites de la normale [145]. Cette dilatation relative n'a pas été retrouvée dans les suites de façon constante [135, 136, 146]. Enfin, la variation du volume ventriculaire en fin de diastole chez les patients en choc septique semble n'avoir dans certains travaux aucun impact sur la survie [147].

La relaxation ventriculaire gauche est logiquement aussi altérée dans ce contexte. Ainsi, dans le travail de Landesberg *et al.*, la dysfonction diastolique était évaluée sur le mouvement de la paroi ventriculaire gauche au niveau de l'anneau mitral par doppler tissulaire : l'onde E'. Les auteurs retrouvaient qu'une réduction de l'onde E' et une augmentation du ratio E/E' était significativement associées à la mortalité indépendamment d'autres facteurs confondant et en particulier de la dilatation ventriculaire gauche non-retrouvée dans ce travail. Près de 40% des patients présentaient dans ce travail une diminution isolée de E', et donc une dysfonction diastolique centrée sur la compliance sans dysfonction ventriculaire gauche associée apparente [148]. D'autres travaux confirmaient ces résultats par la suite [149]. L'infiltration du tissu myocardique par des cellules de l'immunité, l'œdème cellulaire, l'œdème interstitiel pourraient expliquer ces troubles de la compliance [150].

#### Fonction ventriculaire droite

Paradoxalement, bien que la dysfonction ventriculaire gauche existe dans près de 40 à 60% des cas durant le choc septique, l'élévation des pressions ventriculaires gauches est modérée ou absente et le plus souvent inférieure à 15 mmHg [134, 144]. La présence d'une dysfonction ventriculaire droite est une explication pour comprendre physiopathologiquement l'absence d'élévation des pressions de remplissage ventriculaire gauche. Ainsi dans une première étude observationnelle en 1984, 13/25 patients en choc septique présentaient une dysfonction ventriculaire droite associée à une dysfonction gauche (8/25) ou non (5/25) [151]. Dans les suites, ces travaux ont été confirmés et retrouvent une incidence élevée de la dysfonction ventriculaire droite autour de 30 à 50% [136, 152].

Néanmoins, la fonction ventriculaire droite reste difficile à évaluer durant le choc septique de par les facteurs associés, en particulier de post-charge, qui peuvent biaiser



l'évaluation de sa contractilité intrinsèque. L'exemple le plus fréquent étant le choc septique qui complique un syndrome de détresse respiratoire aigu.

### *Marqueurs biologiques de la dysfonction cardiaque*

Durant le choc septique, deux biomarqueurs semblent présenter un intérêt lié à la gravité et donc au pronostic : la troponine et le BNP (B-type natriuretic peptid).

#### La troponine

L'élévation de la troponinémie est classique durant la phase initiale du choc septique. Entre 40 et 85% des patients présentant un choc septique ont une élévation de la troponine I [153-155]. Certains travaux suggèrent que l'élévation de la troponine est associée à la dysfonction systolique tandis que d'autres tendent à démontrer que l'élévation de la troponine T est surtout le reflet de la dilatation ventriculaire droite et des troubles de la relaxation ventriculaire gauche [149, 153-155]. Les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la troponine sont très probablement en rapport avec les conséquences d'une part inflammatoires du choc septique et d'autre part ischémiques focales non coronariennes [156].

#### Le B Natriuretic Peptid

L'élévation du BNP plasmatique est retrouvée très fréquemment durant la phase initiale du choc septique [157-159]. A l'inverse de la troponine, les travaux d'évaluation du BNP comme biomarqueur de dysfonction systolique ventriculaire gauche sont contradictoires [160]. L'interprétation d'une augmentation de son taux est loin d'être univocale. Si pour certains auteurs, une valeur élevée de BNP à 72 heures est un facteur de mauvais pronostic, pour d'autres, les facteurs confondants tels que l'insuffisance rénale restreignent son interprétation [157, 158]. Une élévation du BNP à la phase initiale du choc septique pourrait simplement refléter la présence d'une défaillance rénale ou d'une

dysfonction cardiaque droite dans le cadre d'un syndrome de détresse respiratoire aigu [157]. Il n'existe par ailleurs qu'une faible corrélation entre la pression télédiastolique ventriculaire gauche et le BNP [157]. Il ne permet donc pas dans le cadre du choc septique le diagnostic et le suivi fiables de l'insuffisance cardiaque aiguë. Si le BNP est un marqueur potentiellement intéressant, les facteurs confondants qui concourent à son élévation sont nombreux et doivent être connus du réanimateur.

La défaillance cardiaque durant le choc septique est donc précoce, biventriculaire, à la fois systolique et diastolique. Elle est parfois sévère mais systématiquement réversible dans les 7 à 10 jours qui suivent son diagnostic. Les mécanismes qui concourent à son apparition commencent à être correctement décrits et sont de niveaux supra-cellulaire et cellulaire.

### **Mécanismes de niveau supra-cellulaire**

#### ***Altération du débit sanguin coronaire***

Il a longtemps été supposé que la réduction du débit coronaire était, durant l'état de choc septique, la principale cause d'altération de la fonction cardiaque. Cette hypothèse est aujourd'hui abandonnée et, dans tous les cas, ne représente pas le *primum movens* de la dysfonction cardiaque septique. Il s'avère au contraire que le débit sanguin coronaire est conservé, voire élevé, au cours du choc septique réanimé [161, 162]. Qui plus est, Hotchkiss *et al.* n'ont pas retrouvé d'hypoxie cellulaire cardiomyocytaire (évaluée par le [18F] fluoromisonidazole, sur un modèle de péritonite septique chez le rat) [163]. Dans ce cadre nosologique, une élévation de la troponine, comme indiqué dans le chapitre précédent, reflète principalement l'atteinte inflammatoire du tissu cardiaque. Néanmoins, une réanimation volémique insuffisante peut aggraver la dette tissulaire en

oxygène par une diminution de son transport artériel lié à la baisse du débit cardiaque [164].

### *Atteinte microcirculatoire*

S'il ne fait pas de doute que la physiopathologie de la cardiomyopathie septique n'est pas d'origine ischémique macro-circulatoire, les troubles de la microcirculation ont par contre une place prédominante. Ainsi dans un travail expérimental de choc endotoxinique chez le chien, on retrouvait une redistribution inadéquate du débit sanguin coronaire au sein du cœur gauche, associée à une diminution de la consommation du lactate et à une diminution du travail externe [165]. L'œdème endothélial et des dépôts non-occlusifs de fibrines participent entre autres à la maldistribution du débit sanguin coronaire [166]. Par ailleurs, la perméabilité endothéliale capillaire myocardique est augmentée durant le choc septique. Une des explications évoquée est une augmentation de l'infiltration du tissu myocardique par les cellules mononuclées qui, en majorant le processus inflammatoire, vont augmenter la fuite hydro-sodée du capillaire vers le tissu [167]. En effet, les cardiomyocytes sont activés par le  $TNF\alpha$  et l' $IL1\beta$ . Ils vont alors libérer des chémokines LIX et KC et du Facteur d'Activation Plaquettaire (PAF) qui vont favoriser la migration transendothéliale des neutrophiles dans le tissu cardiaque [168].

### *Dysautonomie*

La dysautonomie ou dysfonction du système nerveux autonome est décrite comme une des principales causes de la dysfonction cardiovasculaire durant le choc septique. Ainsi, Annane *et al.* ont retrouvé chez des patients en choc septique une perte de la variabilité tensionnelle et fréquentielle cardiaque comparable à la variabilité de sujets sains allongés au repos. Ces mêmes sujets sains présentaient des taux minimales de catécholamines circulantes alors que les sujets septiques avaient au contraire des

valeurs multipliées par trois des concentrations de ces mêmes catécholamines [169]. Néanmoins, le débat persiste quant à l'imputation de cette dysautonomie dans la dysfonction cardiovasculaire durant le choc septique. En effet, la tachycardie est avant tout un phénomène adaptatif durant le choc septique pour répondre à la dette en oxygène tissulaire par une augmentation du transport artériel en oxygène. L'hypovolémie, l'hyperthermie et la stimulation adrénergique accélèrent de façon adaptée la fréquence cardiaque. Néanmoins, certains peuvent arguer que la persistance de cette tachycardie malgré une réanimation bien conduite (*i.e.* patient euvoémique, doses stables de catécholamines et processus infectieux contrôlé) pourrait refléter un état d'hyperadrénergie inadapté. On retiendra qu'il n'existe pour le moment que peu de travaux chez l'homme retrouvant une relation entre tachycardie persistante et survie [170]. Une des raisons évidentes pour expliquer la faiblesse des travaux existants est qu'il est bien difficile de s'affranchir des facteurs confondants et, en particulier durant le choc septique, de l'hypovolémie.

### **Mécanismes de niveau cellulaire**

#### ***Anomalies du transit calcique (figure 11)***

Les anomalies du transit calcique au cours du choc septique participent de façon prépondérante dans la cardiomyopathie septique. On peut segmenter en deux parties ces anomalies : d'une part, les anomalies qualitatives du calcium en rapport avec la gestion des flux et stocks de calcium entre le cytosol et les organelles ; et, d'autre part, les anomalies qualitatives en rapport avec la perte de sensibilité des myofilaments au calcium. La figure 11 reprend les principaux mécanismes altérés du transit et de la sensibilité du calcium durant le choc septique.

De façon schématique, ce sont à la fois l'agression endotoxinique et l'inflammation cytokinique qui vont modifier et altérer le transit calcique. Ainsi, les canaux calciques de

type L sont quantitativement diminués au cours du choc endotoxinique chez le lapin avec pour conséquence une altération de la fonction ventriculaire gauche [171]. Les mêmes effets sur ce canal sont observés *in vitro* sur des cardiomyocytes de rat exposés à de l'endotoxine ou à l'IL1 $\beta$  [172]. La conséquence est une diminution de la concentration intracytosolique de calcium pendant la systole et donc une altération de la contractilité. Par ailleurs, la durée de la systole est aussi raccourcie en raison de l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendants, ce qui, en conséquence, va entraîner un raccourcissement de la durée du potentiel d'action et donc limiter l'entrée de calcium dans la cellule [173]. La régulation des flux de calcium intracytosolique est aussi altérée entre le cytosol et le réticulum sarcoplasmique au cours du choc septique. La densité des récepteurs à la ryanodine est diminuée dans le choc septique expérimental avec pour conséquence une diminution du relargage cytosolique de calcium par le RS [174]. De façon similaire, le processus de réabsorption du calcium par le RS est sous la dépendance de la SERCA activé par la déphosphorylation du phospholamban. Durant le choc septique, le phospholamban est moins phosphorylé et par conséquent reste associé au SERCA. [175, 176]. Il est important de souligner que ces événements concernent plus spécifiquement la phase tardive hypodynamique du choc septique. Au contraire, à la phase précoce, le phospholamban est plus phosphorylé et donc la SERCA plus active [176]. Le phospholamban étant directement phosphorylé par la Protéine Kinase A (PKA), il est probable que la modulation adrénérgique joue un rôle prédominant sur cette protéine durant le processus septique. Enfin, les anomalies du transit calcique influent directement sur la concentration mitochondriale de calcium et sont responsables dès la phase précoce du choc septique d'une surcharge calcique pro-apoptotique mitochondriale [177].

La réduction de la sensibilité des myofilaments au calcium est un aussi un élément essentiel de la dysfonction cardiaque septique [178, 179]. Le mécanisme sous-jacent

n'est que partiellement compris. Néanmoins, il n'implique aucune anomalie quantitative ou de répartition énergétique ou d'action directe du monoxyde d'azote [179]. Une phosphorylation prolongée de la troponine C sur les serines 23/24 par la PKA semble associée à une diminution de la sensibilité des myofilaments [180].

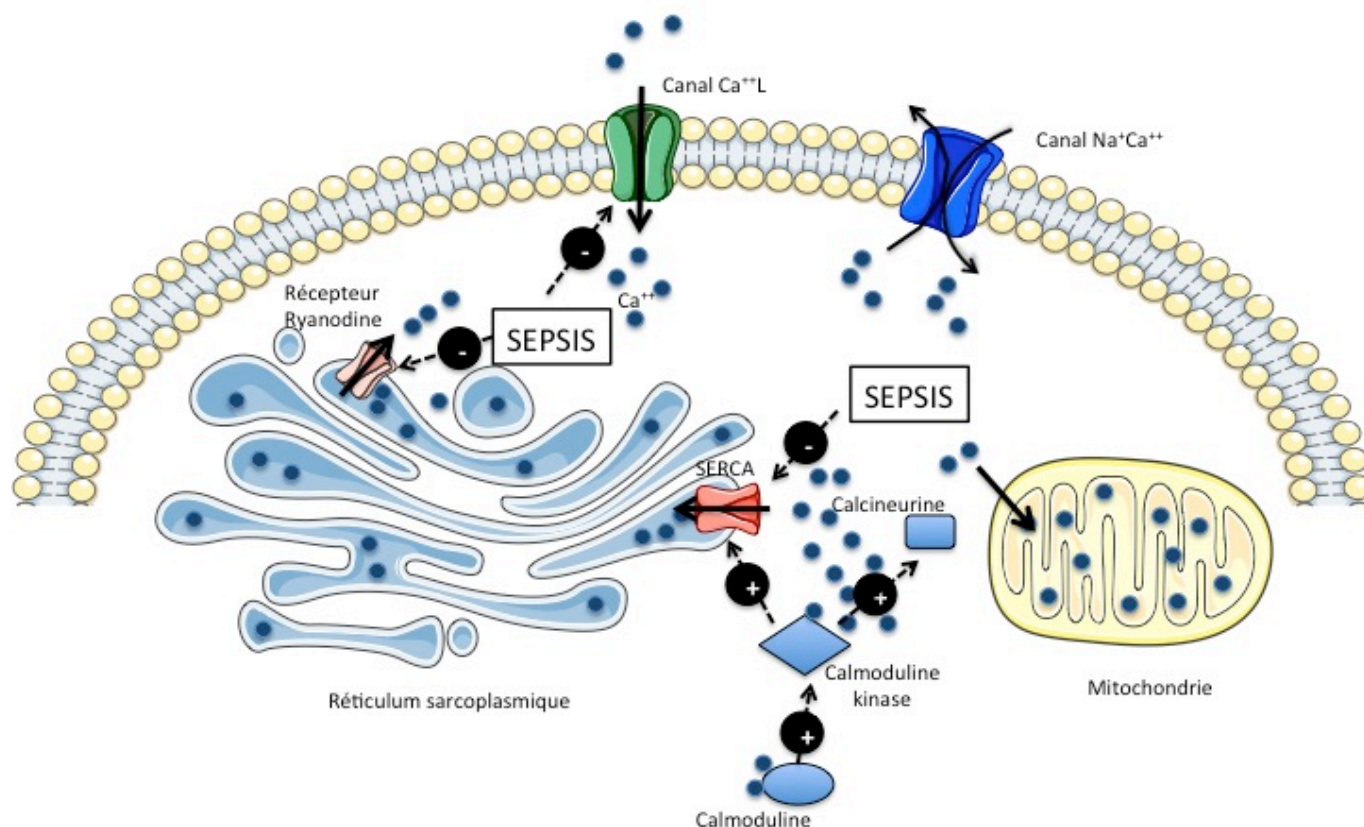


Figure 11 : Schéma simplifié du transit calcique au sein du cardiomyocyte d'après [181]. Le sepsis altère le fonctionnement du canal calcique de type L, le récepteur à la Ryanodine et du couple SERCA/phospholamban (non représenté). Parallèlement, le calcium se lie à la calmoduline et à la calmoduline kinase. Cette dernière active la calcineurine qui va interagir avec le pore de transition mitochondrial et ainsi favoriser l'entrée de calcium dans la mitochondrie au risque d'être pro-apoptotique.

### *Systeme adrenergique et $\beta$ 1-Adrenorecepteurs (figure 12)*

Cette thématique est développée dans la dernière partie de l'introduction : Modulation  $\beta$ -adrénergique au cours du choc septique. La stimulation  $\beta$ 1-adrénergique

cardiomyocytaire est avant tout un élément de réponse physiologique pour répondre à l'augmentation des besoins en oxygène de l'organisme au cours du choc septique. Néanmoins l'excès de stimulation adrénergique caractéristique du choc septique a aussi des effets délétères. Dans cette situation, il existe une diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques à la surface des cardiomyocytes [182, 183]. Il s'y associe une diminution d'expression des protéines  $G_{s\alpha}$  et une augmentation des protéines  $G_i$  [184, 185]. L'ensemble de ces altérations aboutit à une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) avec une diminution de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et par ce biais à une diminution d'activité de la PKA.

Dans un modèle *in vitro* sur des cardiomyocytes de souris stimulés par du LPS, l'activation  $\beta$ 1 adrénergique par dobutamine, favorise la survenue de l'apoptose cardiomyocytaire, l'activation des caspases 3, 9, 8, et augmente la concentration intracytosolique de calcium [186]. Indépendamment du processus septique, il est intéressant de souligner que c'est par le système  $\beta$ 1 adrénergique que se manifestent les effets proapoptotiques des catécholamines *via* une surcharge calcique secondaire à l'ouverture des canaux calciques dépendants [187]. Au total, l'altération du système  $\beta$ 1 adrénergique cardiomyocytaire peut se faire à différents niveaux dont nous avons présenté uniquement quelques exemples. Les conséquences sont une dégradation de la fonction ventriculaire gauche. Cette altération s'associe dans le cadre du choc septique à une réponse inflammatoire concomitante marquée par des taux élevés d'iNOS [188, 189]. Le système  $\beta$ 1-adrénergique étant ubiquitaire, il est aussi présent sur les cellules de l'immunité. Il existe probablement aussi, durant le processus septique, une interrelation étroite entre les cellules de l'immunité mononuclées infiltrées dans le tissu myocardique et la dysfonction cardiomyocytaire [190].

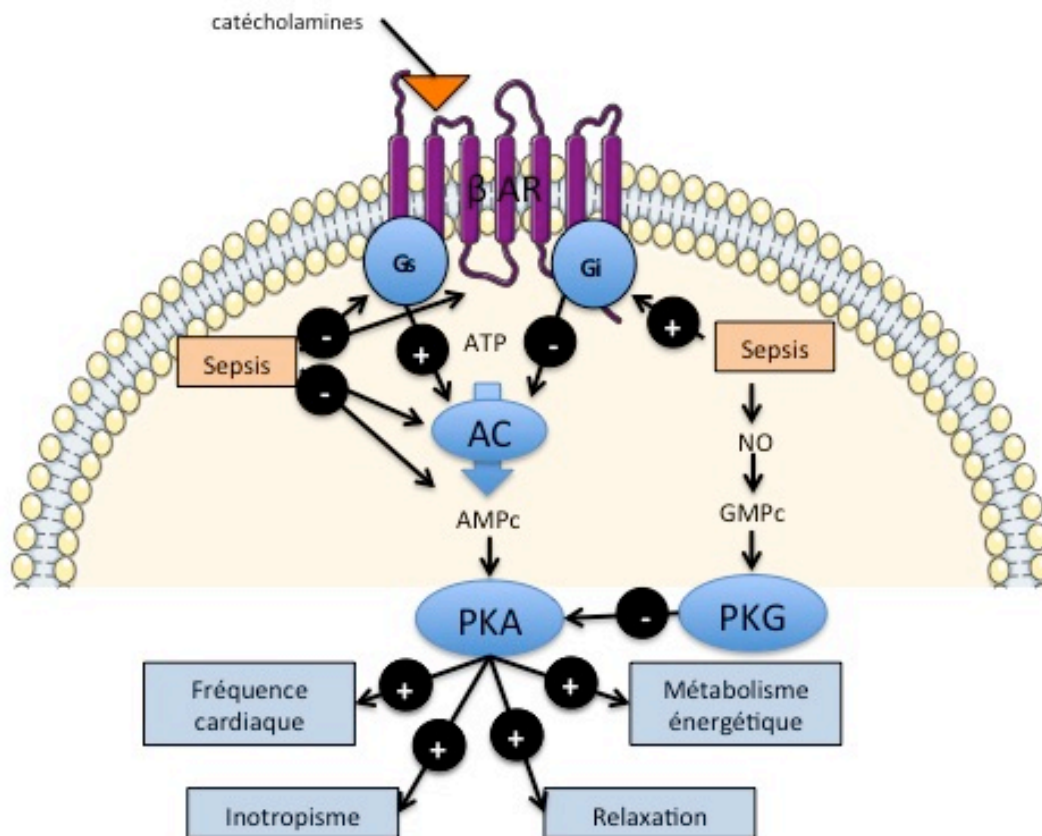


Figure 12 : Transduction du signal adrénérique : les catécholamines se fixent sur le récepteur  $\beta_1$  adrénérique ( $\beta$  AR) adapté de [181]. Ce récepteur active les protéines  $G_i$  ( $G_s$ ) qui sont couplées à l'adénylate cyclase (AC), permettant la transformation de l'ATP en AMPc et au final l'activation de la Protéine Kinase A (PKA). Les protéines G sont à la fois stimulatrices ( $G_s$ ) et inhibitrices ( $G_i$ ) et modifient la transduction du signal. Le processus septique va altérer le fonctionnement de la transduction du signal adrénérique directement sur les  $\beta$  AR, les protéines G, l'AC, l'AMPc, la PKA *via* la Protéine Kinase G (PKG). La PKG est activée *via* le monophosphate de guanosine cyclique (GMPc). Le GMPc est produit par la Guanylate cyclase qui est activée par le Monoxyde d'Azote (NO) produit en grande quantité durant le sepsis.

### ***Dysfonction mitochondriale***

La dysfonction mitochondriale a une place centrale dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque septique.



Physiologiquement, l'ATP consommé par le cœur, provient bien plus de l'oxydation des acides gras que de l'utilisation du glucose. Comme décrit plus haut, l'oxydation de ces substrats permet la production d'espèces réduites comme le NADH et le FADH<sub>2</sub> qui vont alimenter en électrons la chaîne respiratoire et permettre la production d'ATP.

Chez les sujets septiques, il a été démontré à plusieurs reprises que la cardiomyopathie septique, évaluée *ex vivo* sur colonne de Langendorff ou *in vivo* par échocardiographie, était corrélée à la dysfonction mitochondriale [150, 191]. Cette dysfonction mitochondriale se traduit par une diminution des complexes de la chaîne respiratoire, une augmentation de la production d'espèces radicalaires, et une augmentation de taille et de fragilité des mitochondries [150, 192]. Les mécanismes sous-jacents sont nombreux. L'augmentation de la production d'ERO et d'ERA va directement inhiber la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. Cette majoration de la concentration des radicaux libres est liée à l'augmentation de production de NO et d'ion superoxyde et à la déplétion intra-mitochondriale en agents antioxydants comme décrit dans les chapitres précédents [193]. L'ADN mitochondrial est, quant à lui, directement altéré par les conséquences de l'injection de LPS. Paradoxalement, le monoxyde d'azote et les radicaux libres vont aussi promouvoir la synthèse de nouvelles mitochondries [194].

La respiration cellulaire est associée à la phosphorylation oxydative de l'ATP. Cette association ne se fait pas avec un ratio de un pour un. L'exemple le plus connu est celui des mitochondries de la graisse brune dont le couplage partiel permet une dissipation de l'énergie de la respiration cellulaire sous forme de chaleur. Ce découplage est lié aux protéines découplantes mitochondriales (UCP) telles que UCP1 dans la graisse brune, et UCP2 et 3 dans le cœur. Les fonctions de UCP 2 et 3 sont nombreuses et débattues, particulièrement durant le choc septique [195, 196]. L'activation de ces protéines serait responsable par leur action de découplage, théoriquement, d'une restriction de synthèse d'ATP, mais aussi d'une diminution de production d'anion superoxyde [197]. La

surcharge calcique mitochondriale est aussi une cause de la dysfonction mitochondriale qui participe à la cardiomyopathie septique. Son origine est l'ouverture du pore de transition mitochondrial qui est un canal calcique voltage dépendant, à haute conductance, sensible à la cyclosporine. Ce canal situé sur la membrane interne mitochondriale interagit avec l'ensemble des autres récepteurs et canaux calciques qui participent au transit calcique perturbé durant le choc septique (cf. le chapitre « Transit calcique »). Son ouverture durant le choc septique est responsable de la perte du potentiel de membrane mitochondrial, d'une altération de la respiration mitochondriale, d'un œdème de l'organelle pouvant aboutir à la rupture de la membrane externe et finalement à l'activation des voies pro-apoptotiques [198]. Sur un modèle de choc endotoxine chez le rat, l'administration d'un inhibiteur du pore de transition (cyclosporine A) permet l'amélioration de la fonction cardiaque évaluée *ex vivo* sur colonne de Langendorff probablement *via* des effets protecteurs mitochondriaux [199].

### **Signalisation inflammatoire**

Comme pour les cellules de l'immunité, TLR4 est aussi exprimé à la surface des cardiomyocytes. Le rôle de TLR4 à la surface des cardiomyocytes dans la genèse de la dysfonction cardiaque d'origine septique a longtemps été discuté. En effet, l'hypothèse principale était que l'inflammation initiatrice de la cardiomyopathie septique provenait de l'activation des leucocytes [200]. Sans être exclusive, cette hypothèse s'est complétée par la découverte de la présence des TLR4 et 2 à la surface même du cardiomyocyte [201-203]. TLR2 est indispensable à la reconnaissance des germes à gram positif et à l'apparition de la cardiomyopathie septique dans le choc septique polymicrobien [204]. Les Heat Shock Proteins (HSP) sont des protéines chaperonnes qui ont des fonctions protectrices de certaines protéines lors de stress cellulaire. En cas de traumatisme, de sepsis, l'expression des HSPs est augmentée en particulier au niveau des polynucléaires neutrophiles [205]. Dans un travail *in vitro*, HSP60 apparaît comme étant un ligand

extracellulaire de TLR4 responsable de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, de l'apoptose et de la dysfonction cardiomyocytaire [206].

L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B promeut la traduction et la transcription d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Pour reprendre le chapitre relatif aux cytokines, deux facteurs sont identifiés comme étant les médiateurs principaux de la dysfonction cardiaque : IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . Dans un travail expérimental, Kumar *et al.* ont montré qu'*in vitro*, l'adjonction de IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  était responsable d'une réduction transitoire mais profonde du raccourcissement des cardiomyocytes. Ces deux cytokines agissent, qui plus est, de façon synergique. Par ailleurs, les autres médiateurs de l'inflammation testés : IL2, IL4, IL6, IL10, IL8 et IFN $\gamma$ , n'ont aucun impact sur la contractilité des cellules cardiomyocytaires [207]. Néanmoins, d'autres travaux sont contradictoires et retrouvent des associations où IL6, 8 et 10 pourraient participer à la dépression myocardique septique [208]. La synthèse de TGF  $\beta$ , cytokine avec des effets anti-inflammatoires multiples, permet de corriger la dépression induite *in vitro* sur des cellules cardiomyocytaires par IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  ou du sérum de patients en choc septique [209].

La synthèse de monoxyde d'azote par la NO synthase inductible est initiée en partie par la synthèse d'IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  [210]. Par ailleurs, le NO va induire une dépression cardiaque *via* la réduction de production d'AMPc secondaire à la stimulation  $\beta$  adrénergique [211, 212]. Cette réduction de la concentration d'AMPc est la conséquence de l'augmentation de production par le NO de la GMPc, puis de son effecteur, la PKG [213-215]. De façon tout à fait similaire à ce qui a été décrit dans les chapitres précédents, l'augmentation de synthèse de NO est associée à une augmentation de synthèse de peroxy-nitrite qui participe de façon critique à la dysfonction myocardique. Ainsi, dans un travail expérimental princeps sur le sujet, Ferdinandy *et al.* ont montré sur un modèle de cœur isolé-perfusé que l'administration d'un mélange de cytokine pro

-inflammatoires entraînent une élévation majeure de la concentration de NO, de nitrotyrosine et de dityrosine (marqueurs de peroxy-nitrites). L'introduction d'inhibiteurs de la NO synthase et de l'ion superoxyde réduit la dépression myocardique induite par la perfusion de ces cytokines [216].

### **Apoptose**

L'hypoxie induite par la maldistribution du débit sanguin coronaire au niveau microvasculaire et la dysoxie secondaire à la dysfonction mitochondriale sont des facteurs de risque de déplétion énergétique et donc de mort cellulaire. Néanmoins, la littérature est divergente sur le sujet. En effet, les études humaines *post mortem* de patients en choc septique ne retrouvent que de faibles pourcentages de myocarde nécrotique [217]. L'apoptose est pourtant un phénomène qui indubitablement participe à la dysfonction cardiaque septique. Ainsi, durant le choc septique, plusieurs travaux expérimentaux ont retrouvé qu'une activation des caspases de type 3, pro-apoptotiques, participait directement à la dysfonction ventriculaire gauche [218-220]. Cette dysfonction serait liée à des modifications de sensibilité des myofilaments au calcium, à des anomalies induites anatomique du sarcomère et probablement aussi à des clivages des protéines contractiles [221]. L'activation de la phosphatase A2 par la caspase 3 est un des mécanismes qui va participer au clivage des protéines contractiles [222]. L'utilisation d'inhibiteurs des caspases était dans des modèles expérimentaux endotoxiniques associée à une réversion complète de la dysfonction cardiaque [219, 220].

Le système  $\beta$  adrénergique est lui aussi intimement lié à l'activation des voies pro-apoptotiques (voir le chapitre « Modulation  $\beta$  adrénergique durant le choc septique »).

Le facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF : Macrophage Migration Inhibitory Factor) et le  $\text{TNF}\alpha$  sont des facteurs à l'origine de l'activation des caspases

[223, 224]. MIF, par ailleurs, participe à l'activation des voies de signalisation Junk et P38MAPKinase, qui vont préférentiellement favoriser les processus d'apoptose mitochondriale [224].

La signalisation gérée par les Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) tient une place centrale dans l'apoptose et donc dans la cardiomyopathie septique. La voie la plus connue est celle impliquant l'Extracellular Signal Regulated Kinase  $\frac{1}{2}$  (ERK  $\frac{1}{2}$ ), P38MAPKinase et c-Jun N-terminal Kinase. Son activation participe aux mécanismes d'ischémie-reperfusion-apoptose durant le choc septique ou l'ischémie coronarienne [225].

Les histones circulantes sont des produits de la dégradation de l'ADN, témoin de la mort cellulaire, au cours du choc septique. Elles agissent comme des PAMPs et il existe un lien de causalité entre le taux d'histones circulantes, le degré de dysfonction cardiaque septique et donc le pronostic [226].

L'impact de l'apoptose sur la dysfonction myocardique semble expérimentalement évident. Néanmoins, la cardiomyopathie septique est un processus réversible sans séquelle en 5 à 10 jours. L'initiation de l'apoptose induit une dysfonction cardiaque qui n'aboutit pas à une nécrose myocardique. Par conséquent, la terminologie utilisée d'apoptose n'est peut être pas la plus légitime.

## Physiopathologie de la défaillance vasculaire

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2011 fournie *in extenso* en annexe 4 [227].

## Modulation $\beta$ -adrénergique durant le choc septique

### $\beta$ -adrénorécepteurs et cascade de signalisation

Les  $\beta$ -adrénorécepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il existe trois sous types de  $\beta$ -adrénorécepteurs au niveau cardiaque : les  $\beta_1$ , les  $\beta_2$  et les  $\beta_3$ . Le gène du récepteur  $\beta_1$  adrénergique est porté par le chromosome 10, celui du récepteur  $\beta_2$  est porté par le chromosome 5, tandis que le gène du récepteur  $\beta_3$  est porté par le chromosome 8. Schématiquement, au niveau ventriculaire, le récepteur  $\beta_1$  représente 70 à 80% des récepteurs  $\beta$  adrénergiques tandis que le récepteur  $\beta_2$  représente les 20 à 30% restants [228]. Le récepteur  $\beta_3$  est, quant à lui, exprimé essentiellement lorsqu'il existe une forte stimulation adrénergique [229].

Leurs distributions et effets pour le reste de l'organisme sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 4 : Distribution du système  $\beta$ -adrénergique d'après [230].

	<b>Cible</b>	<b>Récepteurs impliqués et effets</b>
<b>Coeur</b>	Muscle cardiaque Fréquence cardiaque	$\beta_1$ , $\beta_2$ Contraction $\beta_1$ , $\beta_2$ Accélération $\beta_3$ Régulation
<b>Vaisseaux</b>	Cellules musculaires lisses Artères coronaires Artère hépatique Artères des muscles squelettiques Veines	$\beta_2$ Relaxation $\beta_2$ Dilatation $\beta_2$ Dilatation $\beta_{12}$ Dilatation $\beta_2$ Dilatation
<b>Tractus respiratoire</b>	Muscles lisse bronchique et bronchiole	$\beta_2$ Relaxation
<b>Tractus digestif</b>	Muscles lisse du tractus gastrointestinal Sphincters du tractus gastrointestinal Foie Cellules adipeuses	$\beta_2$ Relaxation $\beta_2$ Contraction $\beta_2$ Augmente glycolyse et néoglucogénèse $\beta_1$ , $\beta_3$ stimulent la lipolyse
<b>Tractus Urinaire</b>	Rein Détrusor Sphincters	$\beta_1$ stimule la sécrétion de rénine $\beta_2$ Relaxation $\beta_2$ Relaxation
<b>Système reproductif</b>	Utérus	$\beta_2$ Relaxation
<b>Système nerveux</b>	Muscles ciliaires	$\beta_2$ Relaxation
<b>Système immunitaire</b>	Monocytes, lymphocytes...	$\beta_1$ pro-inflammatoire $\beta_2$ anti-inflammatoire
<b>Système de la coagulation</b>	Plaquettes	$\beta_1$ agrégation plaquettaire

Les mécanismes d'activation des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques sont décrits dans le chapitre « Système adrénergique et  $\beta_1$  adrénorécepteurs » en association avec la figure 12. Ainsi pour rappel, la stimulation des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques induit successivement l'activation des protéines G $\alpha_s$ , de l'adénylate cyclase, de l'AMPc et de la PKA dépendante de l'AMPc. C'est grâce à cette dernière que vont être phosphorylées des protéines telles que le phospholamban, les canaux calciques de type L, et la troponine I. Le système  $\beta_1$  adrénergique va aussi promouvoir l'apoptose, lorsqu'il est activé de façon prolongée par des agents  $\beta$  mimétiques. La modulation de l'expression des canaux calciques de type L, des flux de calcium au sein du réticulum sarcoplasmique et de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  va aussi favoriser la survenue de ces processus pro-apoptotiques. Ainsi, en réponse à la stimulation  $\beta_1$  adrénergique, on observe une augmentation du calcium intracellulaire qui va activer la protéine kinase Calcium/calmoduline (CaMKII). A son tour, cette protéine va promouvoir la voie apoptotique mitochondriale *via* le relargage du cytochrome c, qui va aboutir à l'activation de la protéine Caspase 9 et à la mort cellulaire [231, 232]. L'activation  $\beta_1$  adrénergique favorise aussi la survenue d'arythmies cardiaques. En effet, les  $\beta_1$  agonistes vont réduire le courant potassique rectifiant entrant (IK1), qui est indispensable à la stabilisation du potentiel d'action dans sa phase de repos [233]. Néanmoins, la durée de la stimulation, les zones anatomiques du cœur impliquées, et aussi l'action possible sur d'autres canaux (IKS...) vont modifier le caractère pro-arythmogène de la stimulation  $\beta_1$  adrénergique [234]. Qui plus est, la stimulation des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques va aussi majorer l'activité du canal *if* *via* l'augmentation de l'AMPc [235]. Sur le plan métabolique, l'inhibition sélective du système  $\beta_1$  adrénergique par métoprolol dans une étude clinique chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche est associée à une réduction du métabolisme oxydatif évalué par PET scan [236].



Le système  $\beta 2$  adrénergique emprunte une signalisation différente de la voie  $\beta 1$  adrénergique qui va elle réguler en première instance la contraction/relaxation myocardique [237]. En effet, sans rentrer dans les détails, la stimulation de la voie  $\beta 2$  adrénergique va activer les protéines  $G\alpha i$  et  $G\beta\gamma$  (hétérodimère formé par les sous unités  $\beta$  et  $\gamma$ ). L'ensemble, d'une part, va avoir une action inhibitrice sur l'adénylate cyclase et, d'autre part, va activer la cascade de signalisation initiée par la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). L'activation du système  $\beta 2$  adrénergique a un effet inotrope positif dont la régulation va être sous la dépendance des phosphodiésterases 3 et 4 (PDE) [238]. Ainsi, l'administration intraveineuse d'un  $\beta 2$  mimétique tel que la terbutaline va améliorer, chez les sujets sains, la contractilité de façon indépendante de la voie  $\beta 1$  adrénergique [239]. Le système  $\beta 2$  adrénergique a d'autres effets sur le cœur qui incluent une action anti-apoptotique *via* l'activation de la PI3K. Il existe des modèles d'infarctus du myocarde chez le rat où la stimulation  $\beta 2$  adrénergique spécifique par fénotérol réduit le nombre de cellules apoptotiques [240]. La stimulation  $\beta 2$  adrénergique est d'autant plus intéressante qu'elle a des effets qui sont à la fois anti-apoptotiques propres mais aussi antagonistes des effets pro-apoptotiques secondaires à la stimulation  $\beta 1$  adrénergique [241]. En terme de cascade de signalisation, l'activation de la PI3K va également activer Akt. Cette dernière va inhiber la protéine glyco-gène synthase 3 (GSK-3) et les promoteurs de la mort cellulaire associés à Bcl-2 [242]. Les récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques ont d'autres effets tels que l'augmentation du risque d'arythmies cardiaques et la modulation du métabolisme énergétique. La stimulation des récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques est, sur un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque chronique chez le cochon d'Inde, responsable d'une augmentation de l'incidence des arythmies ventriculaires. Les voies de signalisation identifiées incluent l'activation des protéines Gs, l'AMPC et la PKA et/ou

l'inhibition des protéines Gi et de la PDE [243]. Sur le plan métabolique, la régulation  $\beta 2$  adrénergique reste partiellement comprise. Physiologiquement, le cœur utilise la  $\beta$  oxydation des acides gras au repos pour produire 70% de son énergie, 10 à 30% sont fournies par l'oxydation du glucose et le reste provient de l'utilisation des corps cétoniques, du lactate et des amino-acides [244]. Lorsque le cœur est soumis à une stimulation  $\beta 2$  adrénergique, en situation de stress inflammatoire par exemple, il existe des modifications du métabolisme énergétique. Ainsi, on observe dans cette situation une diminution de la consommation des acides gras et une augmentation de l'utilisation du glucose pour produire de l'ATP [245]. Le mécanisme sous-jacent implique l'activation de la PI3K qui va phosphoryler et inactiver la protéine TBC1D4 (substrat d'AKt). Cette dernière, dans sa forme active non phosphorylée, inhibe la translocation du transporteur du glucose GLUT4 depuis les vésicules intracytoplasmiques vers la membrane cytoplasmique [246]. La stimulation  $\beta 2$  adrénergique va donc augmenter la phosphorylation de TBC1D4 et par là favoriser l'expression de GLUT4 à la surface des cardiomyocytes et ainsi l'utilisation préférentielle du glucose. En parallèle, TBC1D4 est aussi une cible de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK), qui est une enzyme clef de la régulation de l'entrée du glucose dans la cellule indépendamment de la stimulation insulinique [247]. Des concentrations élevées d'AMPK sont retrouvées lorsqu'il existe une stimulation  $\beta 2$  adrénergique. Il s'agit probablement d'une conséquence de l'augmentation du ratio AMP/ATP [248]. La stimulation  $\beta 2$  adrénergique participe aussi à la régulation du contenu intracellulaire en glycogène. Ainsi, les agonistes  $\beta 2$  adrénergiques vont augmenter la phosphorylation de la protéine GSK3 qui se trouve de la sorte inhibée. La GSK3 inhibe la Glycogen Synthase (GS). En conséquence, la phosphorylation de la GSK3 augmente l'activité de la GS et le contenu intracellulaire en glycogène. La GSK3 est, quant à elle, régulée par la PI3K qui est sous la dépendance de l'activation  $\beta 2$  adrénergique [249]. Ces résultats restent à confirmer par la suite.

Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  ont une caractéristique commune qui les différencie des récepteurs  $\beta_3$ . En effet, une forte stimulation de ces deux récepteurs est associée à une désensibilisation qui est liée à l'existence de sites de phosphorylation par la PKA et à la kinase des récepteurs  $\beta$  adrénergiques ( $\beta$  ARK) qui se situent sur leur extrémité C-terminale [250]. Le récepteur  $\beta_3$  n'est pas pourvu de ces sites de phosphorylation et est par conséquent non-soumis à un processus de désensibilisation en cas de forte stimulation adrénergique [251]. La voie  $\beta_3$  adrénergique reste encore mal connue. Néanmoins, elle est probablement fortement impliquée dans la régulation négative en cas d'une sur-stimulation sympathique [252].

### **Modulation de la réponse inflammatoire par le système adrénergique**

Le système sympathique est au centre de la régulation du processus inflammatoire et constitue comme le disent Elenkov *et al.* « une interface essentielle entre le cerveau et le système immunitaire » [253]. La quasi totalité des cellules immunitaires présentent à leurs surface des récepteurs adrénergiques [254]. Schématiquement, il faut rappeler que la majorité des organes sont reliés au système nerveux autonome avec des afférences sympathiques et parasympathiques. Néanmoins, en fonction du type d'organe, un type d'afférence peut être prédominant. Ainsi, dans le cadre du système lymphoïde, les afférences sont très majoritairement sympathiques avec, comme neurotransmetteurs principaux, la noradrénaline et le neuropeptide Y [255]. Deux médiateurs de l'inflammation sont plus particulièrement à l'origine de la stimulation du système nerveux autonome dans sa branche sympathique. Ainsi, la production de  $\text{TNF}\alpha$  et d'IL1 en réponse à un stimulus infectieux ou dans des maladies inflammatoires comme dans l'arthrite juvénile va entraîner des modifications au niveau du système nerveux central et plus particulièrement au niveau du *locus ceruleus*, siège du système nerveux

autonome [256, 257].  $\text{TNF}\alpha$ , sur des modèles murins, présente plutôt des effets inhibiteurs, tandis que l'IL1 exerce des effets stimulateurs [258, 259]. Cette activation aboutit à deux événements : d'une part, le relargage de noradrénaline par le système nerveux sympathique et, d'autre part, la libération d'adrénaline dans le flux sanguin par la glande surrénalienne. En parallèle, le système hypothalamo-hypophysaire surrénalien est activé (cf. le chapitre neuro-hormonal de l'axe corticotrope). Les cibles de l'innervation noradrénergique sont principalement des cellules immunitaires non-activées telles que les cellules présentatrices d'antigènes, les macrophages, les lymphocytes T, les thymocytes ou les cellules mastocytaires [260].

L'activation adrénergique du système immunitaire est associée à la promotion d'une réponse plutôt anti-inflammatoire comme présentée dans la figure 13.

La stimulation des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques sur les cellules de l'immunité est responsable d'une réponse anti-inflammatoire. Ainsi, l'adjonction de propranolol, un antagoniste non sélectif des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, chez des souris soumises à un choc endotoxinique par LPS, est associée à l'inverse à l'augmentation de la production d'IL12 et de  $\text{TNF}\alpha$  [261, 262]. De même, certains polymorphismes du gène codant pour le récepteur  $\beta_2$  adrénergique sont responsables d'une augmentation de la mortalité chez les patients présentant un choc septique [263]. On pourrait s'attendre à ce qu'une stimulation exogène des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques soit corrélée à une diminution de la réponse inflammatoire et donc à des effets hémodynamiques favorables et à une amélioration de la survie [264]. Cette hypothèse ne se trouve que très partiellement justifiée. En effet si *in vitro et in vivo*, il est observé effectivement une réduction de la production de  $\text{TNF}\alpha$  en réponse à une stimulation endotoxinique par LPS chez la souris, aucune amélioration de la survie n'est retrouvée [264]. Un autre travail plus récent retrouve des effets anti-inflammatoires comparables lors de l'administration orale d'un  $\beta_2$  agoniste sur un modèle plus robuste de choc septique par CLP [265]. Néanmoins,

d'autres études expérimentales présentent des résultats contradictoires. L'isoprotérol, en activant les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques de fibroblastes cardiaques, entraîne *in vitro* une augmentation de synthèse d'IL6 indépendante de la PKA mais associée à P38-MAPKinase [266]. De même, *in vitro*, l'activation des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques par du Salméterol sur une lignée de macrophages est-elle associée à l'augmentation de la transcription et de la traduction d'IL1  $\beta$  et d'IL6. Cette augmentation est indépendante de la PKA et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B mais rejoint plutôt les voies ERK1/2 et P38-MAPKinase [267]. Il est important de noter que cet effet contradictoire pro-inflammatoire survient en l'absence d'un stimulus endotoxinique par LPS. Pour complexifier encore le tableau, lors d'un choc endotoxinique, les effets anti-inflammatoires d'une stimulation  $\beta_2$  adrénergique sont régionalisés. Ainsi, les effets sont bien moins marqués au niveau de l'intestin grêle dans sa portion proximale qu'au niveau du colon.

Même si les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques sont majoritaires en situation physiologique sur les cellules immunitaires, la présence des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques est aussi impliquée dans la régulation de la balance inflammatoire. *In vitro*, sur des monocytes humain, l'exposition à du LPS et l'adjonction d'Isoprotenerol augmente de façon synergétique la production d'IL1 $\beta$ . Cette augmentation est dépendante de la voie  $\beta_1$  adrénergique, de l'AMPc et de la PKA. Il est important de souligner que dans le cas présent, la stimulation par du LPS était associée à une augmentation de l'expression des récepteurs  $\beta_1$  par rapport aux récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques [268].

La noradrénaline est la catécholamine de première intention dans la prise en charge du choc septique. C'est avant tout un  $\alpha_1$  et 2 agoniste qui va aussi être à l'origine d'une activation des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques présents à la surface des macrophages et entraîner la synthèse de TNF $\alpha$  [269]. De façon similaire, la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$

adrénergiques à la surface de cellules mononucléées immunitaires comme les monocytes est associée à l'augmentation de la production d'IL1 et de TNF $\alpha$  [270].

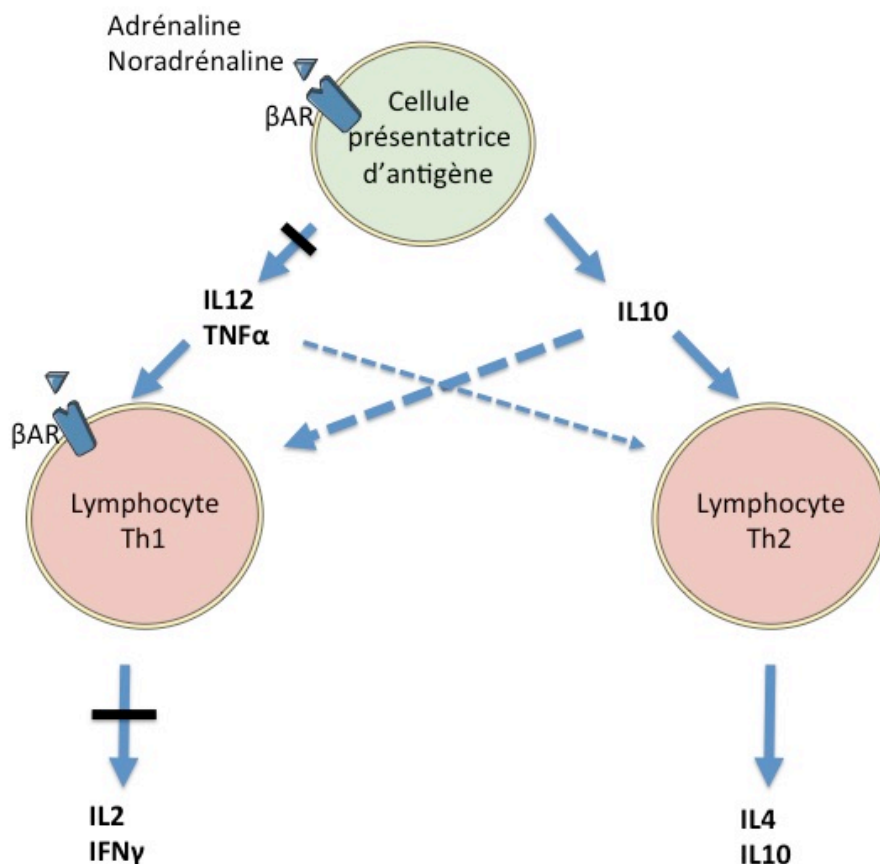


Figure 13 : Effets systémiques d'une stimulation  $\beta_2$  adrénergique sur le profil phénotypique des lymphocytes Th d'après [271].  $\beta$  AR :  $\beta$  adrénorécepteurs. Les catécholamines augmentent la production d'IL10 et IL4 *via* les cellules Th2. Néanmoins, il n'y a pas de stimulation Th2 directe par les récepteurs  $\beta$  adrénergiques. En effet, très peu de récepteurs  $\beta$  adrénergiques sont présents à la surface des cellules lymphocytaires Th2. L'activation des lymphocytes Th2 se fait donc indirectement *via* la levée de l'inhibition exercée par l'IL12 dont la production est inhibée par la stimulation adrénergique.

Au regard de la littérature présentée, on comprend que la modulation de l'inflammation ne passe pas par un seul type sous-type de récepteur adrénergique. Dans le cadre du choc septique, la stimulation  $\beta 2$  adrénergique semble dispenser des effets anti-inflammatoires. On comprend donc de façon quasi intuitive que l'administration d'un antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques durant le choc septique a tout intérêt à être cardio-sélective  $\beta 1$ . En effet, l'inhibition conjointe des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques ne peut présenter que des effets délétères.

Comme présenté dans le chapitre sur la place du système  $\beta$  adrénergique dans l'immunité innée et adaptative, il est fort probable que la stimulation des récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques soit associée à une modération de l'inflammation systémique *via* la promotion d'une immunité adaptative Th2 [272].

## **Impact d'un traitement antagoniste des récepteurs $\beta 1$ adrénergiques**

### *Pourquoi moduler le système $\beta$ adrénergique durant le choc septique ?*

Malgré les avancés dans la prise en charge du choc septique, la mortalité de cette pathologie reste inacceptable. Qui plus est, l'amélioration de la survie sur les dix dernières années est très clairement secondaire à une amélioration dans la rapidité des processus diagnostique et thérapeutique sans qu'il existe pour autant de nouvelles molécules [5]. La modulation du système adrénergique pourrait être une hypothèse thérapeutique. En premier lieu, il est légitime de s'interroger sur la pertinence d'une telle thérapeutique et donc de la réalité des effets délétères de l'excès de la stimulation sympathique.

La physiopathologie du choc septique, présentée dans les chapitres précédents, repose sur une stimulation dérégulée de l'inflammation dont les conséquences sont les altérations des fonctions cardiaque, vasculaire, de la coagulation jusqu'à la survenue de

la défaillance multi-organes. L'origine de cet excès d'inflammation prend naissance principalement dans l'activation de l'immunité innée. En réponse à cette agression, le système sympathique est activé et permet la synthèse et la libération d'adrénaline et de noradrénaline. Les conséquences physiologiques sont l'augmentation de l'inotropisme myocardique, l'accélération de la fréquence cardiaque, la vasoconstriction, les modifications métaboliques de la consommation en oxygène des tissus et l'immunomodulation. Néanmoins, cette stimulation adrénergique excessive a aussi des effets délétères. Paradoxalement, c'est bien l'excès d'inflammation et non pas l'inflammation en elle-même qui est délétère. L'initiation d'une réponse inflammatoire est indispensable à la réponse de l'organisme face à l'infection et son inhibition totale est soit inefficace soit aussi délétère que son exacerbation inappropriée [55].

Annane *et al.* ont observé sur un petit collectif de patients en choc septique *versus* une population témoin qui subissait un test d'orthostatisme, une perte de la variabilité de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. En parallèle, les patients en choc septique avec une hypovariabilité présentaient des taux de catécholamines circulantes identiques aux patients contrôles en orthostatisme. Cette association perte de la variabilité/taux élevés de catécholamines soulignait une activation inappropriée du système nerveux sympathique [273]. Qui plus est, cette perte de la variabilité de la fréquence cardiaque est un phénomène précoce qui peut être à même de laisser prévoir une évolution péjorative d'un sepsis en choc septique [274].

La stimulation  $\beta$  adrénergique est associée à des effets cardiaques délétères. Outre les conséquences recherchées chronotrope et inotrope positives, on observe aussi une altération de la lusitropie, *i.e.* de la fonction diastolique. Cette altération de la relaxation est fréquemment retrouvée durant le choc septique et sa sévérité est associée à une surmortalité [144, 275, 276]. De façon similaire, une augmentation prolongée de la fréquence cardiaque augmente la consommation en oxygène du myocarde et est



associée aussi bien en situation aiguë que chronique à une surmortalité [277-279]. Néanmoins, dans le contexte de la réanimation et plus encore du choc septique, le lien de causalité entre tachycardie et surmortalité reste à démontrer. Une tachycardie prolongée en situation de bas débit peut en elle-même altérer la fonction myocardique. En effet, au-delà d'un certain seuil de fréquence, la tachycardie va réduire la durée de la diastole et altérer le remplissage ventriculaire, par suite diminuer à terme le débit cardiaque, conséquence inverse de la raison de cette tachycardie. De par la réduction de la durée de la diastole, la perfusion coronaire va aussi diminuer. Dans un modèle canin de sténose coronarienne, l'induction d'une tachycardie prolongée va générer des lésions d'ischémie sous-endocardiques malgré des traitements anticoagulant et antiagrégant adaptés [280]. Cette présentation pourrait se transposer, à un certain degré, au patient coronarien tachycarde en choc septique. Finalement, la présentation pathologique la plus caractéristique de la sur-stimulation adrénergique reste le cas de la cardiopathie de stress dans le cadre de maladies telles que le phéochromocytome ou de façon beaucoup plus commune, indépendamment de toutes causes organiques sous-jacentes, comme dans le cas de la cardiopathie de Takotsubo [281-283]. Les catécholamines, bien qu'indispensables à la restauration d'une hémodynamique stable durant l'état de choc, peuvent aussi exercer à fortes posologies une toxicité pro-apoptotique directe sur le muscle cardiaque. Sur des modèles expérimentaux chez le rat, *in vivo*, l'isoprénaline, l'adrénaline et la noradrénaline sont les plus à risque d'induire une souffrance tissulaire myocardique [284]. La dobutamine, catécholamine  $\beta_1$  mimétique de première intention dans la défaillance cardiaque, peut aussi induire lorsqu'elle est perfusée à forte concentration une dysfonction cardiaque [285]. Dans la très grande majorité des cas, ces cardiopathies adrénergiques sont réversibles *ad integrum*. Les mécanismes à l'origine de la dysfonction cardiaque adrénergique sont liés à l'exagération des processus physiologiques. Schématiquement, ils incluent la surcharge calcique liée à

l'augmentation de la concentration de l'AMPc, la formation d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène et de l'azote à l'origine de lésions mitochondriales et l'activation des voies pro-apoptotiques.

Si les effets délétères d'une activation excessive du système sympathique semblent tangibles, l'indication d'un traitement antagoniste ou modulateur du système sympathique reste encore difficile à préciser. Néanmoins, une cible thérapeutique se dégage de l'analyse de la littérature. La tachycardie persistante semble en effet un reflet de l'excès d'activation adrénergique. Pourtant, il est difficile en pratique clinique de différencier une tachycardie adaptative bénéfique durant l'état de choc d'une tachycardie persistante reflet d'une activation inadaptée du système nerveux sympathique. La persistance d'une tachycardie malgré la prise en charge des facteurs confondants (volémie, anémie, fièvre, douleurs, bas débit) serait une indication théorique à l'instauration d'un traitement antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques.

### *Etudes animales*

Pour résumer de façon compréhensible les nombreux travaux expérimentaux qui portent sur l'impact d'un traitement antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques durant le choc septique, il a été décidé de réaliser un tableau synthétique. Dans ce tableau, le modèle, sa gravité et les effets cardiovasculaires et inflammatoires sont rapportés.

Tableau 5 : Synthèses des études portant sur l'évaluation des effets de l'administration d'un traitement antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques dans des modèles animaux septiques sur les fonctions cardiaque, vasculaire, inflammatoire et sur la survie.

Auteurs	Modèle et Gravité	Groupes	Méthodologie	Fonction cardiaque Bloquant (βB) vs CLP	Inflammation : impact du β-Bloquant (βB) vs CLP	Mortalité Bloquant (βB) vs CLP
Oberbeck, 2004 [286]	CLP chez la souris. Gravité modérée	<u>Inflammation :</u> 12 groupes (n=8 par groupe) : - Contrôle - Propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc) - Epinéphrine - Epinéphrine+ propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc) - Sham - Sham+propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc) - Sham + épinéphrine - Sham + propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc) + épinéphrine - CLP - CLP + épinéphrine - CLP + propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc) - CLP+épinéphrine+ propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc)	<u>Inflammation</u> (évaluation à 48H) : - Cytokines plasmatiques - prélèvement de la rate : *évaluation de l'apoptose *prolifération splénocytaire - Sous-populations lymphocytaires	NA	- Diminution de la prolifération des splénocytes - Augmentation de l'apoptose splénocytaire - diminution d'IL2 (splénocytes) - diminution d'IL6 (splénocytes) - Augmentation des monocytes lymphocytes	- Sham : 0/32 - CLP : 15/32 - CLP + épinéphrine : 16/32 - CLP + propranolol : 20/32 - CLP+épinéphrine+ Propranolol : 25/32
Suzuki, 2005[287]	CLP chez le rat. Gravité faible	<u>Hémodynamique et inflammation :</u> 3 groupes (n= 10 ou 11 par groupe) : - SHAM - CLP + esmolol (10 mg.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> iv) - CLP+ esmolol (20 mg.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> iv)	<u>-Hémodynamique</u> (évaluation à 24H) : - Fréquence cardiaque - Pression artérielle moyenne - Lactate - Cœur isolé perfusé  <u>Inflammation</u> (évaluation à 24H) : - Compte leucocytaire, - TNFα, IL1β dans le plasma - Densité β adrénocepteurs dans le cœur en immunohistochimie	- Ralentissement de la fréquence cardiaque dans les groupes βB  Amélioration: - Débit cardiaque - Dpdtmax - Dpdtmin - Travail cardiaque et de l'efficacité cardiaque  -Augmentation de la densité des adrénocepteurs β1	- Pas de modification du lactate - Pas de modification du compte leucocytaire - Diminution TNFα Pas de modification de IL1β	NA
Schmitz, 2007 [288]	CLP chez la souris, Gravité modérée	<u>Inflammation :</u> 6 groupes : - Contrôle - Propranolol (0,5 mg.kg <sup>-1</sup> sc)	<u>Inflammation</u> (évaluation à 48H) : - IL-6 et INFγ au niveau des splénocytes	NA	-Diminution : IL-6 et INFγ (splénocytes) - Augmentation de	- Sham 32/32 - CLP 17/32 - CLP + Propranolol 10/32

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sham</li> <li>- Sham+Propranolol (0,5 mg.kg<sup>-1</sup> sc)</li> <li>- CLP</li> <li>-CLP + Propranolol (0,5 mg.kg<sup>-1</sup> sc)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apoptose splénocytaire</li> <li>-Prolifération splénocytaire</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>l'apoptose splénocytaire</li> <li>- Diminution de la prolifération splénocytaire</li> </ul>	
Ackland, 2010 [289]	CLP, péritonite fécale (PF), endotoxémie chez le rat, Gravité modérée	<p><u>Etude de survie</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sepsis + métoprolol (n=16, 100 mg.kg<sup>-1</sup> ip)</li> <li>- Sepsis + aténolol (n=15, 6 mg.kg<sup>-1</sup> ip)</li> <li>- Sepsis (n=25, LPS ou CLP ou PF)</li> </ul> <p><u>Hémodynamique :</u> <i>Echocardiographie</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PF (n=16)</li> <li>-PF + métoprolol (n=16, 2 mg.kg<sup>-1</sup> iv, puis 0.5 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de 6 à 24H puis 0.25 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de 24 à 48H)</li> </ul> <p><i>Cathéter de Conductance</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PF</li> <li>- PF + métoprolol (2 mg.kg<sup>-1</sup> à H2 de la PF)</li> </ul> <p><u>Inflammation :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Métoprolol +LPS (30 mg.kg<sup>-1</sup>, ip)</li> <li>-Saline + LPS</li> </ul>	<p><u>Etude de survie :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Administration des βB pendant 2j puis réalisation CLP ou injection LPS (30 mg/kg IP)</li> <li>- Ou administration des βB 6 H après LPS</li> </ul> <p><u>Hémodynamique</u> (évaluation à 6H, 24H, 48H après la péritonite fécale):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Echocardiographie</li> <li>- Cathétérisme de conductance</li> </ul> <p><u>Inflammation:</u> (Prétraitement par métoprolol pendant 2j avant LPS et évaluation à 6h):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma : IL6 (ELISA)</li> <li>- Foie : IL6, IL10, IL1β, TNFα, INFγ (PCR) et expression génique inflammatoire (PCR)</li> <li>- Cœur : IL18, MCP-1 (Western blot)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ralentissement de la fréquence cardiaque dans les groupes βB environ 20%</li> <li>- Amélioration du volume d'éjection systolique</li> <li>- Maintien de la fraction d'éjection du ventricule gauche</li> <li>- Pas de diminution du débit cardiaque</li> <li>- Amélioration du dpdtmax et du dpdtmin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du taux plasmatique d'IL6</li> <li>- Diminution en PCR dans le foie : IL6, IL10, IL1β, TNFα, INFγ</li> <li>- Diminution dans le cœur : IL18, MCP-1</li> <li>- Diminution de la transcription des gènes de l'inflammation hépatique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LPS vs. LPS + Métoprolol ou Aténolol (administrés pendant 48 h avant LPS) : Amélioration de la survie</li> <li>- LPS vs. LPS + Métoprolol ou Aténolol (administrés 6 h après LPS) : Pas d'amélioration de la survie</li> <li>- CLP vs. CLP + métoprolol (administrés pendant 48 h avant CLP) : Allongement de la survie</li> <li>- PF vs. PF+ métoprolol (administré 6h après PF) : Pas d'amélioration significative de la survie</li> </ul>
Aboab, 2011 [290]	Cochon, LPS, Gravité modéré	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LPS (n=5)</li> <li>- LPS + ésmolol (n=5, titrée pour une diminution de 20% de la fréquence cardiaque)</li> </ul>	<p>Evaluation à H0, à 1H post LPS, à 3H post LPS et 5H post LPS :</p> <p><u>Hémodynamique :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Données du cathéter artériel pulmonaire et artériel systémique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ralentissement de la fréquence cardiaque de 20%</li> <li>- Pas de modification significative de la pression artérielle moyenne, de l'index cardiaque</li> <li>-Augmentation dans le groupe βB du volume d'éjection systolique indexé</li> </ul>	NA	NA

				- Pas d'augmentation sur les deux dernières heures des résistances vasculaires systémiques dans le groupe $\beta$ B		
Mori, 2011 [291]	CLP chez le rat, Gravité légère	<p><u>Survie :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CLP (n=9)</li> <li>-CLP + Esmolol (n=10, 15 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> iv)</li> </ul> <p><u>Hémodynamique, inflammation et histologie :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CLP (n=10)</li> <li>- CLP + Esmolol (n=10, 15 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> iv)</li> </ul>	<p><u>Hémodynamique</u> (évaluation à 0, 6, 12 et 18 H):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fréquence cardiaque</li> <li>- Pression artérielle moyenne</li> <li>- lactate</li> </ul> <p><u>Etude de survie</u></p> <p><u>Inflammation</u> (évaluation à 0, 12 et 18 H):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- plasma aux 3 temps : IL1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math>, HMGB-1</li> <li>- lavage broncho-alvéolaire à 18h : concentration des protéines</li> <li>- liquide péritonéal à 18H : L1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math>, HMGB-1</li> </ul> <p><u>Histologie</u> (évaluation à 18H):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- poumon : poids</li> <li>- intestin : score de lésion épithéliale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ralentissement de la fréquence cardiaque de 20%</li> <li>- Pas de diminution de la pression artérielle moyenne</li> <li>- Pas de modification du lactate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pas de détection des cytokines dans le plasma</li> <li>- Diminution du TNF<math>\alpha</math> dans le liquide péritonéal dans le groupe <math>\beta</math>B pas de IL1<math>\beta</math> et HMGB-1</li> <li>-Diminution du score de lésion épithéliale digestive dans le groupe <math>\beta</math>B</li> <li>-Pas de modification du poids du poumon</li> <li>-Pas de modification de la concentration des protéines dans le lavage broncho-alvéolaire</li> </ul>	- Allongement de la durée de survie dans le groupe $\beta$ B
Calzavacca, 2014 [292]	<i>E. coli</i> iv chez l'agneau, Gravité faible	<p><u>Hémodynamique, fonction rénale et inflammation :</u></p> <p>9 animaux en cross over qui reçoivent <i>E coli</i> en iv et à 8H Atenolol (10 mg bolus suivi de 0.125 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> iv) ou placebo.</p>	<p><u>Hémodynamique</u> (recueil en continu jusqu'à H24 post <i>E. coli</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pression artérielle moyenne</li> <li>- Fréquence cardiaque</li> <li>- Débit cardiaque</li> <li>- Débit artériel rénal</li> <li>- Transport et la consommation en oxygène</li> </ul> <p><u>Fonction rénale</u> (évaluation à 0, 8, 10,12, 24 H après injection <i>E. coli</i>) :</p>	<p>chez les animaux <math>\beta</math>B :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ralentissement de la fréquence cardiaque</li> <li>- Diminution du débit cardiaque</li> <li>-Maintien de la pression artérielle moyenne</li> </ul> <p>Pas de différence entre les</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de modification entre les animaux traités ou non sur IL10 et TNF<math>\alpha</math>.</li> <li>- Maintien dans le groupe Atenolol d'un niveau élevé d'IL10 par rapport au groupe contrôle</li> </ul>	NA

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Créatinémie</li> <li>- Clairance de la créatinine</li> <li>- Fraction excrétion de l'urée</li> <li>Fraction excrétion du sodium et du potassium</li> <li><u>Inflammation</u> (évaluation à 0, 8, 10,12, 24 H après injection <i>E. coli</i>) :</li> <li>- TNF<math>\alpha</math>, IL6, IL10</li> </ul>	animaux traités ou non sur : <ul style="list-style-type: none"> <li>- La VO<sub>2</sub> et la DO<sub>2</sub>, le lactate</li> <li>- Le débit artériel rénal</li> <li>- Fraction excrétion de l'urée</li> <li>- Fraction excrétion du sodium et du potassium</li> </ul>		
Ibrahim-Zada, 2014 [293]	LPS chez la souris, Gravité faible	<u>Etude de survie et hémodynamique :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LPS (n=44)</li> <li>- LPS + Esmolol (n=43, 10 mg.kg<sup>-1</sup> en pompe osmotique)</li> </ul>	<u>Etude de survie</u> (évaluation par 12H jusqu'à 120H): <u>Hémodynamique</u> (évaluation à H0 et H48) : -ITV sous aortique <u>Inflammation</u> (à 0, 4 et 48H): - Cartographie de l'activation des gènes de l'inflammation sur les cellules du sang total. - Validation de la cartographie par analyse comparative chez l'homme	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'altération de l'ITV sous aortique dans le groupe <math>\beta</math>B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de la transcription des gènes régulant :            *microbicidie (CAMP)            *l'inflammation (NFkB)</li> </ul>	Amélioration de la survie dans le groupe $\beta$ B
Jacquet-Lagreze, 2015 [294]	<i>P aeruginosa</i> chez le cochon, Gravité modérée	<u>Hémodynamique et microcirculation :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>P aeruginosa</i> + placebo (n=7)</li> <li>- <i>P aeruginosa</i> + Esmolol (n=7, 7.5 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>iv )</li> </ul>	<u>Hémodynamique</u> (évaluation continue de 90 min post induction sepsis à 300min) : -Fréquence cardiaque -Débit cardiaque -Pression artérielle moyenne -Lactate -Résistance vasculaire systémique <u>Microcirculation intestinale et sublinguale</u> (H0, 90 min et 300 min) : - Microvascular flow index - Ratio des villosités perfusées -Proportion des vaisseaux perfusés	Dans le groupe <i>P aeruginosa</i> + $\beta$ B vs <i>P aeruginosa</i> : <u>Hémodynamique :</u> -Réduction de la fréquence cardiaque entre 80 et 90/min  -Diminution du débit cardiaque  -Maintien de la pression artérielle  -Augmentation des résistances vasculaires systémiques  -Pas de différence de lactate	NA	NA

				<u>Microcirculation :</u> - Pas de différence sublinguale - Amélioration du Microvascular flow index dans le groupe βB		
Wang, 2016 [294]	LPS chez la souris, Gravité inconnue	<u>Hémodynamique et inflammation :</u> - Contrôle (n=8-10) - LPS (n=8-10) - Esmolol (n=8-10, 6,7 mg.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> en pompe osmotique) - LPS + Esmolol (n=8-10, 6,7 mg.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> en pompe osmotique)	<u>Hémodynamique (évaluation à 6H):</u> - Fréquence cardiaque - Pression téléstolique ventriculaire gauche - Pression télédiastolique ventriculaire gauche - Dpdtmax - Dpdtmin <u>Inflammation et apoptose (évaluation à 6H):</u> - Activité de la caspase 3 sur le coeur -Caspase 3, Jnk, bcl2, Akt, TNFα, P38 en western blot sur le coeur -TUNEL sur coeur	Dans le groupe LPS+ βB vs LPS:  -Ralentissement de la fréquence cardiaque  - Amélioration de la pression téléstolique ventriculaire gauche  - Amélioration de Dpdtmax  -diminution de la pression télédiastolique ventriculaire gauche	Dans le groupe LPS+ βB vs LPS:  - Diminution de l'apoptose sur TUNEL  - Diminution de l'activité de caspase 3  - Diminution de la forme clivée de caspase 3, de Bax et augmentation de bcl2, diminution Jnk et P38	NA

βB : β-Bloquant ; NA : Non Approprié ; iv : intra veineux, ip : intra péritonéal ; sc : sous-cutané

Qu'est –il raisonnable de retenir d'un collectif d'études aussi disparates ? On retiendra que, chez des animaux en sepsis, choc septique ou choc endotoxinique, l'administration d'esmolol :

- réduit efficacement la fréquence cardiaque ;
- ne dégrade pas l'hémodynamique des animaux malgré la réduction du débit cardiaque ;
- semble moduler efficacement la balance inflammatoire sur un versant anti-inflammatoire ;
- tend à améliorer la survie.

### *Etudes humaines*

Les études humaines sont pour l'instant peu nombreuses. Elles sont le plus souvent rétrospectives, avec une faible population et inhomogènes.

La première expérience pragmatique d'administration d'un antagoniste des récepteurs  $\beta$  adrénergiques durant un processus septique date de 2006, était prospective et concernait six patients dont trois étaient brûlés entre 32 et 51% et trois polytraumatisés. Ces six patients présentaient un sepsis avec une réponse myocardique hyperkinétique, tachycarde à haut débit face à des résistances vasculaire systémiques basses. Aucun patient n'était en état de choc au moment de l'inclusion. L'administration d'esmolol était associée à une réduction de la fréquence et du débit cardiaques, et donc de la consommation en oxygène. Aucune variation significative n'était notée sur les résistances vasculaires systémiques et le débit sanguin hépatique (évalué par la clairance au vert d'indocyanine). Sur le versant métabolique, l'administration d'esmolol ne diminuait pas au niveau du muscle la quantité d'ATP disponible, ce qui reflétait l'utilisation de l'oxygène tissulaire. Enfin, l'esmolol induisait une modification des substrats énergétiques du glucose vers les acides gras.



Cette étude physiologique a été à l'origine de beaucoup des travaux qui ont suivis. En premier lieu, elle a précisé le pourcentage de réduction de la fréquence cardiaque à 20%. Elle a aussi défini que le  $\beta$  bloquant dans cette indication avait tout avantage à être sélectif. Néanmoins, il faut aussi modérer l'impact d'un tel travail. Il n'y avait dans cette étude qu'un petit collectif de patients, tous d'origine chirurgicale avec un sepsis secondaire. Qui plus est, aucun des patients n'était en choc septique et donc ne requérait d'agents vasopresseurs. Finalement, le manque de comparateur avec évaluation au retour à l'état basal limite l'interprétation des données [295].

Schmittinger *et al.* ont rapporté, dans une analyse rétrospective de 40 patients en choc septique présentant une cardiomyopathie septique, les effets hémodynamiques et métaboliques de l'administration de métoprolol et de milrinone. Le métoprolol est un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques sélectif. La milrinone est un agent inotrope positif qui inhibe la phosphodiesterase de type 3 indépendamment de toutes voies adrénergiques [296]. L'hypothèse principale des auteurs était que l'administration de milrinone diminuait la fréquence cardiaque sans altérer le transport et l'utilisation de l'oxygène par le système cardiovasculaire chez des patients en choc septique. Le métoprolol était administré par voie orale de façon « compassionnelle » selon la formule des auteurs. L'objectif était de réduire la fréquence cardiaque sous les 95 battements par minute. Les résultats principaux de ce travail montraient que l'administration de cet antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques était associée à une réduction efficace de la fréquence cardiaque sans altération du débit cardiaque ni baisse des résistances vasculaires systémiques ou de la pression artérielle moyenne pour des doses constantes puis en diminution de noradrénaline. Les auteurs observaient une augmentation du volume d'éjection systolique sous métoprolol. Les effets secondaires rapportés étaient essentiellement une augmentation transitoire de la posologie de noradrénaline. Les auteurs concluaient à un bon profil de tolérance de ce traitement et à un maintien du

débit cardiaque en rapport avec une augmentation du volume d'éjection systolique secondaire au ralentissement de la fréquence cardiaque et donc à l'allongement de la diastole [297]. Néanmoins, il faut modérer ces résultats par une approche pragmatique de la prise en charge actualisée du choc septique. En premier lieu, les patients n'étaient que modérément sévères avec de faibles posologies de noradrénaline. Deuxièmement, il n'existait aucun groupe comparateur permettant de quantifier l'impact du traitement par  $\beta_1$  bloquant. Une évolution favorable, indépendante de ce traitement, était tout à fait envisageable. Enfin, la milrinone est un traitement dont les effets secondaires limitent l'utilisation et qui n'est pas recommandé dans la prise en charge de première intention de la cardiomyopathie septique [5].

Ce précédent travail a été reproduit dans les suites par Balik *et al.* de façon prospective. Ici encore, il s'agissait d'établir l'innocuité de l'administration de l'esmolol chez des patients en choc septique de gravité modérée ( $<0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  de noradrénaline). L'esmolol était administré durant 24 heures chez des patients stabilisés hémodynamiquement par une expansion volémique efficace et des vasopresseurs. Le résultat principal de ce travail portant sur 10 malades était le ralentissement efficace de la fréquence cardiaque sans diminution du débit cardiaque ni de la pression artérielle moyenne pour des doses similaires de noradrénaline. De façon intéressante, les résistances vasculaires systémiques restaient identiques sur les 24 heures de l'administration d'esmolol. On notera néanmoins une diminution notable de la  $\text{SVO}_2$  même si non-significative et ré-augmentant à l'arrêt du traitement. Ce travail rejoint de façon quasi similaire l'étude rétrospective de Schmittinger *et al.* Néanmoins, il faut là aussi noter que la gravité des patients était modérée et, en raison de la baisse de la  $\text{SvO}_2$ , l'on peut s'interroger malgré la bonne tolérance sur la véracité de l'optimisation hémodynamique. Par ailleurs, connaissant les propriétés de la molécule, on est étonné

que les auteurs dans ce contexte aient procédé à la réalisation d'un bolus initial d'esmolol qui est habituellement mal supporté hémodynamiquement [298].

En 2013, a été publiée la première vraie étude prospective, monocentrique, randomisée contre placebo, en ouvert, chez des patients en choc septique. Dans ce travail de phase II, les auteurs avaient pour objectif d'affirmer la capacité de l'esmolol à réduire la fréquence cardiaque entre 80 et 94 battements par minutes chez des patients en choc septique qui présentaient une fréquence cardiaque à plus de 95 battements par minute. Méthodologiquement, les patients étaient inclus après 24 heures de stabilisation hémodynamique et recevaient de l'esmolol en intraveineux continu ou un placebo jusqu'à la sortie ou au décès du patient de réanimation. Les patients étaient monitorés par un cathéter artériel pulmonaire. La mortalité était relevée à 30 jours.

Soixante-dix-sept malades ont été inclus dans chaque groupe sur une période s'étalant de novembre 2010 à juillet 2012. Les patients avaient une gravité moyenne au moment de l'inclusion avec des posologies médianes de noradrénaline inférieures à  $0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  et une lactatémie médiane inférieure à  $2 \text{mmol.l}^{-1}$ . Néanmoins, dans les 24 heures précédant l'inclusion, ces derniers avaient reçu près de 5000 ml d'expansion volémique. L'origine des chocs était majoritairement secondaire à des pneumonies et principalement documentée à bacilles gram négatif. Le résultat principal de ce travail était que les patients qui recevaient de l'esmolol présentaient une fréquence cardiaque constamment inférieure à 90 battements par minute. La tolérance hémodynamique est donnée comme excellente puisque que la pression artérielle moyenne était identique dans les deux groupes. Le débit cardiaque s'abaissait dans les 24 premières heures par rapport au groupe placebo mais s'avérait statistiquement non-différent sur la période d'étude. Dans les deux groupes, une proportion conséquente de patients recevait du levosimendan (49% dans le groupe esmolol et 40% dans le groupe placebo). Comme dans les travaux préliminaires et expérimentaux, le volume d'éjection systolique

augmentait chez les patients qui recevaient de l'esmolol. La quantité perfusée de noradrénaline était plus faible dans le groupe esmolol que dans le groupe placebo. Finalement, la mortalité s'avérait abaissée de façon spectaculaire à 28 jours chez les patients recevant de l'esmolol (49%) par rapport au groupe placebo (80%) [299].

Les résultats de ce travail ont été largement commentés dans la littérature [300-307]. Plusieurs points valent d'être soulignés. Concernant la méthodologie, on ne peut être qu'étonné par la poursuite du traitement  $\beta_1$  bloquant jusqu'à la sortie du patient de réanimation. Par ailleurs, les motifs du début du traitement expérimenté à 24 heures restent à confirmer. En effet, si la tolérance hémodynamique de l'esmolol exige une stabilisation préalable du malade, on peut s'interroger dès lors sur l'intérêt de ce traitement. Les études qui ont expérimenté une molécule novatrice dans le choc septique se sont toutes soldées par des échecs, en partie à cause d'une initiation trop tardive. De ce point de vue, l'étude de Opal *et al.* était un exemple démonstratif [8]. La méthodologie statistique qui utilise une analyse comparative des aires sous les courbes ROC est une approche inhabituelle pour un tel travail comparatif. On peut s'interroger sur les raisons d'un tel choix sachant que les analyses usuellement utilisées sont robustes. L'approche des aires sous la courbe est habituellement une méthodologie statistique utilisée pour les études pharmacodynamiques.

Dans les résultats, on ne peut qu'être particulièrement admiratif de la rapidité d'inclusion des patients dans cette étude. Sur 600 jours, 144 patients ont été inclus, ce qui représente 1 patient tous les 4 jours ! On remarquera que les patients du groupe contrôle sont tous un peu plus graves que ceux du groupe esmolol même si cela n'atteint pas le seuil de significativité. Par ailleurs, l'adjonction très fréquente de lévosimendan est questionnable. D'une part, même si cela n'est pas significatif, elle est 9% plus importante dans le groupe esmolol et d'autre part il ne s'agit pas d'un traitement de

première intention de la défaillance cardiaque dans les recommandations de la Surviving sepsis Campaign [5].

La mortalité du groupe contrôle est étonnamment élevée à près de 80%. Dans ces conditions, la réduction de la mortalité de 31% par l'adjonction d'esmolol apparaît surprenante. Cette mortalité s'explique mal si l'on considère que les auteurs ont suivi les recommandations d'experts. Qui plus est, la différence de mortalité observée pourrait servir théoriquement de référence pour le calcul des effectifs des prochaines études ayant pour objectif principal la mortalité. Dans ce cas, la réduction de la mortalité pourrait ne jamais être obtenue, tant la différence observée dans l'étude de Morelli *et al.* apparaît éloignée des résultats consignés dans tous les autres travaux. Finalement, ce qui a probablement le plus étonné dans ce travail, c'est la présentation des résultats. En effet, la réduction de la mortalité semble être le résultat central de ce papier alors que, si on le relit de près, c'est simplement la réduction de la fréquence cardiaque qui s'avère avoir été l'objectif principal. Dans la discussion, il est par ailleurs regrettable que les auteurs n'aient pas plus commenté les probables effets métaboliques et inflammatoires qui auraient pu expliquer ces résultats.

Même si ces résultats nous laissent interrogatifs, il ne faut pas non plus oublier qu'il s'agit d'un travail préliminaire qui a suscité autant d'enthousiasme que de scepticisme et que sa reproduction par d'autres équipes ne saurait tarder.

## Problématique générale

Le choc septique est responsable d'une dérégulation du système sympathique dont les principaux stigmates clinico-biologiques sont, malgré une réanimation adaptée, une tachycardie et une activation des voies de l'inflammation avec un impact probable sur le pronostic. Par conséquent, le ralentissement de la fréquence cardiaque en cas de tachycardie à la phase initiale du choc septique pourrait être bénéfique sur les plans cardiovasculaire et inflammatoire, ainsi que, en définitive, sur la survie.

## **Objectifs généraux des travaux**

*Afin de rendre intelligible leur ligne directrice, nous explicitons ici à la suite les uns des autres les objectifs des différents travaux que nous allons présenter. Cet ordre de présentation correspond évidemment à l'ordre logique et chronologique de leur enchaînement et de l'enchaînement des travaux correspondants.*

### **Sujet de recherche numéro 1**

L'objectif de ce premier travail expérimental est de décrire les effets de l'administration précoce d'un  $\beta$ 1-bloquant cardio-sélectif, l'esmolol, sur les profils hémodynamique et inflammatoire d'un modèle expérimental de choc septique.

### **Sujet de recherche numéro 2**

Dans les suites du travail 1, l'objectif de ce deuxième travail est de décrire les effets d'un ralentissement isolé de la fréquence cardiaque par un inhibiteur des canaux *if*, l'ivabradine, sur les profils hémodynamique et inflammatoire d'un modèle expérimental de choc septique.

### **Sujet de recherche numéro 3**

Il s'agit ici d'un travail de clinique humaine de phase II dont l'objectif général est une description en ouvert des effets hémodynamiques macro- et microcirculatoires de l'adjonction d'un  $\beta$ 1-bloquant cardio-sélectif à la phase précoce du choc septique.

## Méthodologie générale des travaux expérimentaux 1 et 2

### Modèle de choc septique expérimental

#### *Ethique (travail 1, 2)*

Les travaux expérimentaux réalisés ont été soumis au comité d'éthique de la faculté de médecine de Nancy et sont en accord avec la législation européenne.

#### *Modèle de choc septique par ligature et ponction cœcale « CLP » (travail 1, 2, 3)*

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de race Wistar d'environ huit à neuf semaines et pesant de 350 à 450 grammes. Chaque animal est hébergé en cage individuelle dans un environnement contrôlé, pendant au moins sept jours après réception dans une animalerie agréée.

L'animal est anesthésié avec de l'isoflurane (Forene®, Abbvie, France) sous oxygénothérapie à 60%. Le contrôle de la température est assuré par une plaque chauffante à 37°. Une laparotomie est réalisée par une incision abdominale, de deux à trois centimètres, dans le sens céphalo-caudal. Le cæcum est exposé et ligaturé par un fil non résorbable de 3/0 (Ethilon 3/0, Laboratoire Ethicon® Johnson and Johnson, France) en évitant une obstruction de la lumière du tractus digestif. Une ponction du cæcum ligaturé, à l'aide d'une aiguille noire de 22 gauges, permet une extrusion de fèces. L'ensemble est réinséré dans la cavité abdominale et une suture de la paroi abdominale est réalisée avec le même fil. Cette intervention permet de mimer les conditions d'une péritonite perforée. Dans le même temps chirurgical, une incision médio-cervicale antérieure est réalisée. La veine jugulaire externe gauche est mise sur un lac et canulée avec un cathéter de type PE-50 (PE-50, Braintree Scientific®, USA). Ce cathéter est tunnélisé en sous-cutané avec un orifice de sortie au niveau de la région médio-cervicale postérieure. La région cervicale antérieure est enfin suturée.



Un harnais en plastique est ensuite disposé sur le rat. Ce dernier est relié à un dispositif métallique pivotant, permettant de protéger le cathéter et de laisser le rat se mouvoir normalement au sein de la cage. Le cathéter est, quant à lui, relié aux dispositifs de perfusion continus. Le rat reçoit immédiatement une dose d'antalgique en intraveineux direct (nalbuphine, Nubain, à la posologie de  $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Serb®, France) et il est ensuite remis dans sa cage où sera surveillé son réveil. Un libre accès à l'eau est assuré lorsqu'il est dans sa cage.

Le rat est perfusé quatre heures après la chirurgie, et ce durant les 14 heures suivantes. Tous les rats, quel que soit le groupe de randomisation, reçoivent à un débit de  $4 \text{ ml.h}^{-1}$  du NaCl 0,9% (NaCl 0,9%, B. Braun Médical SAS®, France) auquel est ajouté un antibiotique large spectre (imipenème plus cilastine, Tienam®, à la posologie de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ , MSD®, France) et un antalgique (nalbuphine, Nubain, à la posologie de  $0,12 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , Serb®, France). Les rats sont randomisés quatre heures après la chirurgie.

## **Evaluation de la fonction cardiaque *in vivo***

### **Hémodynamique invasive basique (Travaux 1, 2)**

Tous les rats ont une mesure invasive de la pression artérielle par un cathéter placé soit en fémoral soit en carotidien gauche. Le signal de pression artérielle est analysé par le logiciel IOX 2.4.2.8® (EMKA Technologies, France).

### **Cathétérisme de conductance (travail 1)**

La première étude décrivant l'utilisation du cathéter de conductance a été réalisée au début des années 80. Cette technique a par la suite été appliquées sur d'autres modèles animaux dont le rat mais aussi chez l'homme [308]. Il s'agit néanmoins d'un outil qui reste confiné majoritairement à la recherche expérimentale. Techniquement, les

mesures sont réalisées par un cathéter intra-ventriculaire qui recueille, en temps réel, les Pressions et les Volumes intra cardiaque gauche *in vivo*.

Le cathéter utilisé se décrit de la façon suivante :

- micromanomètre central ;
- entouré de chaque côté par deux paires d'électrodes de conductance :
  - o distales : en zone apicale du ventricule ;
  - o basales : en zone sous-valvulaire aortique.

La méthode de conductance permet de mesurer les volumes ventriculaires. La conductance se caractérise comme la résistance au passage d'un courant électrique au sein d'un matériau. Elle se définit aussi comme l'inverse de la résistance. Les variations de conductance au sein du matériau sont donc proportionnelles à son volume.

En pratique, la paire d'électrode externe crée un champ électrique à l'intérieur du ventricule dont les variations vont être recueillies par les électrodes internes. Ces variations de conductance du champ électrique entre l'apex et la base ventriculaire gauche sont proportionnelles au volume de ce même ventricule.

### ***Quels sont les paramètres recueillis ?***

Dans un premier temps, le système MPVS-300® (Millar Pressure Volume System 300/400, Millar Instruments inc, USA) va numériser le signal analogique. L'enregistrement des données numérisées est ensuite réalisé au travers de l'interface logicielle IOX 2.4.2.8® (EMKA Technologies, France).

Les paramètres sont soit directement mesurés, soit calculés à partir des courbes de P-V ventriculaires. On peut citer parmi ces paramètres, pour exemple, la pression maximale intra-ventriculaire gauche, la pression de fin de systole, la pression minimale intra-ventriculaire gauche, la pression de fin de diastole, le débit cardiaque, le volume d'éjection systolique...

Les pressions et les volumes ventriculaires gauches sont mesurés chaque milliseconde par le cathéter. Ainsi, une courbe P-V est affichée pour chaque moment du cycle cardiaque.

Les paramètres recueillis peuvent être des pressions (par exemple : la pression maximale ventriculaire gauche, la pression minimale ventriculaire gauche...), ou des volumes (par exemple : le volume ventriculaire gauche de fin de diastole, le volume ventriculaire gauche de fin de systole...) Des paramètres de la contractilité comme  $dp/dt_{max}$  ou de la relaxation comme  $dp/dt_{min}$  ou Tau permettent d'analyser les fonctions systolique et diastolique. Les paramètres calculés peuvent être par exemple le débit cardiaque grâce à l'extraction de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique.

### *Etude de l'inotropisme et de la lusitropie à partir des courbes P-V par la méthode de l'occlusion de la veine cave inférieure*

Les paramètres de base de la contractilité tels que  $dp/dt_{max}$  sont fortement influencés par la précharge et la post charge ventriculaire gauche [309]. Ainsi une technique a été développée afin d'étudier l'inotropisme et la relaxation indépendamment des conditions de pré et post charge.

L'occlusion de la veine cave inférieure sus diaphragmatique par la méthode du fil permet de diminuer de façon transitoire le retour veineux et donc la précharge cardiaque sans pour autant influencer la post charge par un réflexe sympathique [310]. On obtient ainsi une série de courbes P-V de plus en plus petites à mesure que la précharge diminue.

Afin de standardiser les méthodes de recueil des droites d'élastance, un minimum de neuf boucles P-V doit être présent et associé à une diminution de la Pmax de 10 mmHg. A la localisation du moment télésystolique sur chacune de ces courbes correspond une pression ventriculaire gauche décroissante en fonction de la diminution de précharge.

Ces pressions ventriculaires gauches telesystoliques se retrouvent sur une ligne droite qui représente l'inotropisme ventriculaire. Cette droite est appelée « Elastance end systole » (Ees) ou la « End Systolic Pressure Volume Relationship » (ESPVR).

La pente maximale ou Emax est proche de Ees, mais survient souvent quelques millisecondes après Ees. Il existe *in vivo* cependant des différences expérimentales notables entre ces deux indices.

Dans le travail 1, nous n'utilisons que les données de l'inotropisme, indépendamment de la précharge, Emax, pour une postcharge constante, et donc issues de l'occlusion de la veine cave inférieure.

### **Principes techniques**

Le rat, pour cette procédure spécifique, est anesthésié sous isoflurane puis trachéotomisé et ventilé mécaniquement sous 100 % de FiO<sub>2</sub> à une fréquence initiale de 65 min<sup>-1</sup> et à un volume courant de 6 ml.kg<sup>-1</sup> (Rodent Ventilator®, Harvard Apparatus, USA). Une curarisation par Bésilate de Cisatracurium (Nimbex®, laboratoire Glaxosmithkline, France) à la posologie de 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> est réalisée. Une laparotomie sous xyphoïdienne est réalisée suivie d'une incision de la coupole diaphragmatique droite permettant l'exposition de la veine cave inférieure dans sa portion sus diaphragmatique. Un fil de soie est délicatement placé sous la veine cave inférieure afin de réaliser ultérieurement l'épreuve d'occlusion de la veine cave inférieure. La carotide droite est ensuite disséquée sur environ 1 cm de longueur et un cathéter de conductance Millar 2 – Fr. (Mikro-Tip® Catheter Transducer, modèle SPR-838, longueur 12 cm, Millar Instruments) est inséré jusqu'au ventricule gauche. L'extrémité proximale de la sonde est placée en position basale sous aortique. Une calibration « saline » par injection de sérum salé hypertonique 10% (0.2 ml) avec calcul du volume parallèle est réalisée, suivie d'une période de repos de 20 min.

Dans le cadre des travaux réalisés, il n'a été effectué qu'une mesure d'E<sub>max</sub> pendant l'épreuve d'occlusion de la veine cave inférieure.

## Micro-PET (travail 1)

### *Principes*

La méthodologie décrite ci dessous est reprise du travail de Master du Dr Nicolas Dessalles avec son autorisation.

La tomographie par émission de positons (TEP) est une modalité d'imagerie médicale qui mesure la distribution tridimensionnelle d'une molécule marquée par un émetteur de positons. Ces émetteurs de positons, comme le fluor 18 (<sup>18</sup>F), sont des isotopes radioactifs incorporés aux molécules mais qui n'altèrent pas leurs propriétés biologiques. Le traceur radioactif utilisé dans ce travail était le fluorodéoxyglucose marqué au fluor 18 (<sup>18</sup>FDG). L'obtention de l'image TEP s'effectue grâce à des détecteurs répartis en anneau autour du patient auquel un traceur radioactif a été administré. En se désintégrant, un positon émet deux photons  $\gamma$  dans des directions opposées. Ceux-ci sont enregistrés par deux détecteurs indépendants, déterminant la position du positon dans l'espace. A l'échelle d'un organe, on peut ainsi déterminer sa position dans l'espace par la projection des photons qu'il émet sur les détecteurs. Une reconstruction tomographique des données permet d'obtenir la distribution radioactive tridimensionnelle du traceur.

Le service d'imagerie médicale du CHU de Nancy est pourvu d'un micro-tomographe à émission de positons (micro-TEP), permettant la réalisation de l'examen sur petit animal. Parmi les nombreuses applications disponibles, l'examen cardiaque par micro-TEP apporte de nombreux renseignements sur l'hémodynamique et la performance cardiaque.

Les principaux paramètres apportés par la TEP cardiaque évaluée dans ce travail sont : la fraction d'éjection du ventricule gauche, les volumes télésystolique et télédiastolique

du ventricule gauche (VTSVG et VTDVG), le volume d'éjection systolique (VES) et le débit cardiaque. Une étude réalisée dans notre laboratoire pour étudier l'effet de différentes catécholamines dans le choc septique a montré une corrélation entre les mesures hémodynamiques réalisées par le micro-TEP et le cathétérisme ventriculaire par sonde de Millar chez le rat [311].

### *Réalisation de l'examen cardiaque par micro-TEP*

L'examen était réalisé à 18 heures de l'initiation du choc septique, après réanimation et administration des médicaments. Les animaux étaient mis à jeun la veille au soir. Le jour de l'examen, une heure avant l'injection de  $^{18}\text{FDG}$ , une mesure de la glycémie capillaire était réalisée et du glucose était administré en cas de glycémie inférieure à  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ , puis les animaux étaient gavés à l'olbetam à une posologie de  $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . La manœuvre était répétée juste avant l'injection du  $^{18}\text{FDG}$ . L'Olbetam est une molécule permettant d'améliorer la fixation cardiaque du  $^{18}\text{FDG}$ . Une heure après le premier gavage, une dose de  $^{18}\text{FDG}$  était administrée aux animaux par injection dans la veine péniennne avec un volume correspondant à une dose comprise entre 70 et 90 mBq.

Les animaux étaient ensuite réchauffés pendant 30 minutes avant la réalisation de l'acquisition par le micro-TEP.

L'examen par micro-TEP était réalisé sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (induction 3% et entretien 1,5%) avec un débit de gaz frais à  $0,8 \text{ mL.mn}^{-1}$  d'un mélange air/oxygène. La profondeur de l'anesthésie était réglée pour obtenir une fréquence respiratoire entre 45 et 65 cycles.mn<sup>-1</sup>, témoin d'une perte de conscience suffisante à la réalisation de l'examen. Un monitoring des constantes vitales suivantes était réalisé et enregistré tout au long de l'examen : température à l'aide d'une sonde rectale, fréquence cardiaque par trois électrodes placées aux deux pattes avant et à la patte arrière gauche, fréquence respiratoire, pression artérielle invasive par un cathéter

placé dans l'artère carotidienne gauche (Logiciel LabChart 6®). Les médicaments étaient administrés par l'intermédiaire du cathéter veineux jugulaire interne droit mis en place la veille. L'examen était réalisé en deux temps, une phase de stabilisation des constantes vitales d'une durée de 36 minutes permettant d'atteindre les objectifs de pression artérielle, à savoir une augmentation de la PAM de 20% dans le groupe Noradrénaline. Le débit de la seringue de noradrénaline ou placebo était augmenté jusqu'à une posologie maximale de  $2 \mu\text{g.kg.mn}^{-1}$ . Dans un deuxième temps, l'acquisition cardiaque était réalisée, sa durée était de 26 minutes. A la fin de l'examen, un prélèvement sanguin de tous les rats était réalisé pour être centrifugé et congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'animal était sacrifié, puis le cœur était immédiatement prélevé et congelé.

### *Reconstruction des images*

Le traitement des images a été réalisé au Département de Médecine Nucléaire (Nancyclotep) du CHU de Nancy. Pour traiter les images, nous avons utilisé deux consoles de travail : un PC classique : console TEP, et un poste de traitement (E-SOFT) : console SIEMENS de visualisation. L'obtention des images se faisait en quatre étapes :

#### ***Etape 1: Acquisition***

Elle est constituée de quatre phases : la collecte et l'enregistrement des émissions du  $^{18}\text{FDG}$  au niveau cérébral (durée : 36 minutes), la transmission (durée : 6 minutes) : dans cette phase, les photons émis par le cobalt de la couronne de détection traversent l'animal, une carte d'atténuation est établie selon les régions du corps traversées (cellules, tissus ou muscles), puis a lieu une seconde phase de collecte et d'enregistrement des émissions du  $^{18}\text{FDG}$  au niveau cardiaque (durée : 26 minutes), suivie d'une nouvelle phase de transmission (durée : 6 minutes)

#### ***Etape 2: Histogramme***

Cette étape organise (regroupe) les événements (émissions de  $^{18}\text{F}$ FDG) obtenus durant les acquisitions. Chaque période est subdivisée en plusieurs échantillons qui correspondent au cycle cardiaque.

### ***Etape 3: Reconstruction 3D***

Cette étape vise à reconstruire les images en format « CONCORDE ». Une fois le format CONCORDE obtenu, un utilitaire de visualisation médicale, XMEDCON, a permis d'extraire un sous-volume cubique de 64 coupes d'arêtes contenant le cœur. Ce sous-volume est par la suite enregistré en format DICOM.

### ***Etape 4: Analyse***

Les outils d'orientation du cœur sont utilisés sur la console SIEMENS pour réorienter manuellement le cœur reconstruit en 3D. Ce changement d'axe est indispensable pour l'étude en segmentation. Après avoir orienté le cœur, le logiciel QGS (Quantitative Gated SPECT) de la console SIEMENS est utilisé pour la segmentation et la détermination automatique des contours de la paroi cardiaque. Ce logiciel est aussi utilisé pour calculer les différents paramètres cardiaques, notamment le VTDVG, la FE, la vitesse d'éjection et de remplissage du ventricule et le pourcentage de captation du  $^{18}\text{F}$ FDG par les segments. Ces paramètres permettent ainsi d'évaluer les zones nécrotiques du cœur et la qualité de la fonction ventriculaire gauche.

## **Echocardiographie (Travail 2)**

Les mesures échocardiographiques sont réalisées 18 heures après la chirurgie, sous anesthésie à isoflurane 1,5% sous 100% d'oxygène. L'évaluation est réalisée avec l'échographe HP Sonos 5500 (Philips Medical Systems, Andover, MA, USA) et une sonde de 12 Mhz à une profondeur maximale de 2 cm. Toutes les mesures sont réalisées trois fois et moyennées. Sont recueillis au cours de l'exploration ultrasonore :

- le diamètre de l'aorte ascendante, obtenu à partir d'une coupe parasternale grand axe ;



- la fraction d'éjection ventriculaire gauche, obtenue à partir des diamètres de fin de systole et de fin de diastole en parasternale petit axe en mode Temps-Mouvement. La fraction d'éjection est obtenue à partir de l'approximation de la formule de Teicholz.
- l'Intégrale Temps-Vitesse évaluée sur une coupe cinq cavités ;
- la fréquence cardiaque, évaluée à partir de l'intervalle de temps entre deux pics d'ITV selon la formule suivante :
 
$$\text{Fréquence cardiaque} = 60 / \text{intervalle de temps entre deux pics} ;$$
- le volume d'éjection systolique, déterminé selon la formule suivante :
 
$$\text{ITV} \times (\text{diamètre aortique})^2 / 4 ;$$
- le débit cardiaque correspondant au volume d'éjection systolique x la fréquence cardiaque.

### **Etude de survie (Travail 1)**

En suivant la même procédure expérimentale de ligature et ponction cœcale, la survie a été évaluée après randomisation dans deux groupes : CLP et CLP + esmolol. En dehors du traitement par esmolol, l'ensemble des thérapeutiques entreprises suit le protocole expérimental. La survie a été évaluée deux fois par jour.

### **Evaluation de la vasoréactivité *ex vivo* (Travaux 1, 2)**

On entend par vasomotricité la propriété qu'ont les vaisseaux de faire varier leur diamètre grâce à la mise en jeu d'éléments élastiques et musculaires constitutifs de leur paroi. Cette capacité d'adaptation est le résultat d'un contrôle nerveux, humoral et hémodynamique.

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

- les artères de conductance ou élastiques, de gros calibre (chez l'homme, de 1 à 2 cm de diamètre), très élastiques du fait de leur composition élevée en élastine (environ 40%) et dont la fonction principale est le transport du sang. L'aorte, en particulier, joue un rôle capital dans la transformation du débit pulsatile à la sortie du cœur en un débit continu dans les petites artères, puis dans les capillaires. La conduction sanguine suppose le maintien de l'intégrité de la paroi artérielle ;

- les artères de résistance ou musculaires, sont classiquement définies comme des artères de diamètre inférieur à 300  $\mu\text{m}$ , beaucoup moins élastiques (seulement 10% d'élastine), contenant comparativement une plus grande proportion de cellules musculaires lisses, et jouant un rôle prépondérant dans la régulation systémique de la pression artérielle pour une distribution optimale du sang dans chaque tissu.

Le contrôle de l'activité contractile et relaxante de la paroi vasculaire résulte de l'action sur le muscle lisse vasculaire de médiateurs d'origine nerveuse (noradrénergiques vasoconstricteurs, cholinergiques vasodilatateurs) ou endocrinienne (adrénaline vasoconstricteur,...) et de facteurs paracrines libérés localement (comme le NO vasodilatateur).

### ***Principe technique***

En fin de protocole *in vivo*, le rat est sacrifié par hémorragie aiguë sans aucun autre moyen pharmacologique. L'aorte thoracique et le mésentère sont prélevés. Des segments d'artère mésentérique de premier ordre et d'aorte thoracique (2 mm) sont isolés et installés dans un myographe.

Deux tiges métalliques sont insérées dans la lumière du vaisseau aortique ou prélevé, tandis que deux fils sont glissés dans la lumière du vaisseau mésentérique.

L'une d'elles est reliée à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. L'autre tige ou fil métallique est reliée à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) connecté à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données. Chaque segment est immergé dans une cuve de 10 ml contenant une solution physiologique de la composition suivante : 119 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, 14.9 mmol.l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mmol.l<sup>-1</sup> KCl, 2.5 mmol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2.5 mmol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 1,18 mmol.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,5 mmol.l<sup>-1</sup> glucose. Le pH est de 7.4, la solution est bullée avec un mélange de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> et rincée toutes les 15 min. Les segments d'aorte thoracique sont étirés à une tension de 9 mN, et les segments mésentériques à 4 mN permettent le développement d'une tension suffisante pour qu'ils puissent à nouveau exercer leur activité vasomotrice. Ils sont ensuite soumis à l'action de différents agents pharmacologiques vasoconstricteurs (phényléphrine, L NAME,...) ou vasodilatateurs (acétylcholine) à différentes concentrations, et la contraction ou relaxation du vaisseau est enregistrée en continu [312].

### **Evaluation biologique**

Dix-huit heures post ligature et ponction cœcale, et réalisation des procédures in-vivo, 2 ml de sang sont prélevé » puis centrifugé » à 4000 tours par minute pendant 15 min à 4°C. Le plasma surnageant est aliquoté et conservé à -80° pour des analyses ultérieures. Le cœur et l'aorte abdominale sont également excisés immédiatement après la mise à mort de l'animal et conservés à -90° pour des analyses ultérieures.

### **Dosage ELISA (Travaux 1 et 2)**

Un panel de cytokines supplémentaires a été dosé dans les échantillons plasmatiques par technique ELISA semi-quantitative, permettant de comparer les concentrations entre plusieurs échantillons. Le test utilisé permettait de doser quatre conditions en duplicate. Deux kits de 4 timbres ont été utilisés, soit 8 conditions (Proteome Profiler, Rat cytokine array panel A, R&D Systems®). Nous avons réalisé un dosage semi-

quantitatif d'un panel de cytokines et chémokines sur 16 échantillons plasmatiques représentatifs sélectionnés en fonction des valeurs hémodynamiques obtenues au micro-TEP des rats correspondants. Les échantillons plasmatiques étaient décongelés à température ambiante juste avant le début de la procédure. Les timbres étaient dans un premier temps immergés dans 2 mL d'un bain de solution tampon, dans deux plaques rectangulaires 4 puits. Les deux plaques étaient placées sur un agitateur à plateforme pendant une heure. Dans le même temps, les échantillons plasmatiques étaient dilués avec une solution tampon, puis mélangés et incubés avec un cocktail d'anticorps de détection pendant une heure. Chaque timbre était ensuite immergé dans un des mélanges plasma/anticorps et incubé une nuit à 4°C sur un agitateur à plateforme. Le lendemain les timbres étaient lavés avec un mélange de solution tampon et d'eau distillée. Trois lavages de 10 mn étaient réalisés. Une fois lavés, les timbres étaient plongés dans une solution de Streptavidine-HRP diluée et incubés pendant 30 mn à température ambiante. Trois nouveaux lavages des timbres étaient ensuite effectués. Les timbres étaient ensuite retirés de la solution de lavage puis placés sur une feuille de plastique. Un réactif chimique était versé sur chaque timbre pour la révélation des anticorps, puis les timbres placés dans un imageur afin de déterminer la concentration des cytokines et chémokines de chaque échantillon de façon semi-quantitative.

Pour le travail 2, le dosage de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-10 a été réalisé avec le kit Quantikine ELISA; R&D Systems Europe, Abingdon, UK selon les instructions du fabricant.

### **Méthode de Polymérase Chain Reaction quantitative (Travail 1)**

Les amorces pour la réalisation de la RT PCR quantitative ont été obtenues chez Eurogentec (Angers, France). L'extraction d'ARN a été réalisée avec le Kit RNA plus mini Kit (Quiagen, Courtabœuf Cedex, France) selon les recommandations du fabricant. Le dosage des ARN est réalisé par spectrophotométrie (Thermo Scientifique nano drop

1000, USA) par lecture des densités optiques (DO) aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm.

La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses à partir de l'ARN précédemment obtenu en utilisant le kit iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes (Biorad, Marnes-la- Coquette, France).

La phase d'amplification est réalisée avec un système de SYBR green I (Bio-rad). Après une étape de dénaturation réalisée à 95°C pendant trois minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 50 cycles dans « l'Icycler MyiQ single color Realtime PCR detection system » de BioRad. Le schéma d'un cycle est le suivant :

10 secondes de dénaturation à 95°C ;

45 secondes d'hybridation des amorces à 62°C (dépend du couple d'oligonucléotides) ;

60 secondes d'élongation à 72°C.

Les résultats sont analysés par le logiciel MyiQ (Bio-rad).

### **Western Blotting (Travaux 1 et 2)**

L'aorte abdominale et le cœur sont prélevés en fin de procédure *in vivo*, congelés à -80°C, puis broyés dans l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est ensuite homogénéisée, à température ambiante, dans un tampon de lyse à 10% (SDS-PAGE). Après centrifugation à 15000 rotations par minute (rpm) pendant 15 minutes à 15°C, les protéines sont dosées selon la méthode Pierce (BCA protein assay kit). Les lysats obtenus sont déposés dans un gel de polyacrylamide (BIORAD). Les protéines sont ensuite transférées, toute la nuit, à 4°C, sur une membrane de nitrocellulose (BIORAD). Après saturation (2 heures) dans du TBS-T [Tris 100mM pH7,4, NaCl 150mM, Tween 0,1%] en présence de lait écrémé (5%) ou de BSA (Bovin Serum Albumin 2%), les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines à doser. Les membranes sont ensuite

rincées (trois fois pendant cinq minutes) dans du TBS-T et incubées à température ambiante pendant une heure avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase. La peroxydase est révélée par chemiluminescence, après rinçage dans du TBS-T (3 fois pendant 5 mn), grâce à un kit de détection (ECL Plus; Amersham, GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France) et détectée à l'aide du système Fujifilm Las-1000. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à l'actine ou la tubuline et au rouge ponceau, permettant d'attester d'un dépôt régulier d'une même quantité de protéines.

Les protéines explorées dans le cœur et l'aorte sont les suivantes pour le Travail 1 :

- anti-iNOS (BD Biosciences, San Jose, CA) ;
- phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (lapin anti-rat eNOS, phosphorylated [ser1177] ; Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) ;
- phosphorylated-AKT (p-AKT) (lapin anti-rat Akt, phosphorylated [ser473] ; Cell Signaling Technology) ;
- AKT, (Akt-pan [C67E7] ; Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) ;
- phospho-Jnk/JNK (souris, anti-rat Jnk/JNK, phosphorylated [Thr183/Tyr185] ; Cell Signaling Technology) ;
- phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (souris, anti-rat p38 MAPK, phosphorylated [Thr180/Tyr182] ; Cell Signaling Technology) ;
- phosphorylated p44/42 MAPK (Erk1/2) (lapin anti-rat p44/ p42 MAPK, phosphorylated [Thr1202/Tyr204]; Cell Signaling Technology) ;
- phosphorylated NF- $\kappa$ B (Phospho-NF- $\kappa$ B p105 [Ser933] [18E6] ; Cell Signaling Technology) ;
- anti  $\alpha$ 1-adrenoreceptor (mouton, anti-rat  $\alpha$ 1-adrenoreceptor [sc- 1477] ; Santa

Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Pour le travail 2 sur le cœur et l'aorte :

- anti-iNOS (Abcam, Paris, France) ;
- phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (lapin anti-rat eNOS, phosphorylated [ser1177]; Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) ;
- phosphorylated-Akt (p-Akt) (lapin anti-rat Akt, phosphorylated [ser473] ; Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) ;
- Akt (Akt-pan [C67E7]; Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France),
- Phosphorylated NF- $\kappa$ B (Phospho-NF- $\kappa$ B p65 [Ser536] [93H1] ; Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France)
- I $\kappa$ B $\alpha$  [44D4] ; (Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

### Points limites

Pour la procédure CLP :

- Rat « moribond », ne présentant aucune réaction aux stimulations ;
- Rat présentant une pression artérielle systolique sanglante inférieure <60 mmHg lors de la reprise à 18 heures ;

Pour la procédure cathéter de conductance :

- Rat présentant une pression artérielle systolique sanglante inférieure <60 mmHg lors de la reprise à 18 heures.

Pour la procédure échocardiographie :

- Rat présentant une pression artérielle systolique sanglante inférieure <60 mmHg lors de la reprise à 18 heures.

Pour la procédure Micro PET :

- Rat présentant une pression artérielle systolique sanglante inférieure <60 mmHg lors de la reprise à 18 heures.

Pour la procédure d'évaluation de la survie :

- Le point limite sera de 72 heures si les rats ne sont pas morts alors.



## **Travail 1 : L'inhibition $\beta$ 1 – adrénérique améliore les fonctions cardiaques et vasculaires dans le choc septique expérimental**

L'article est fourni en annexe 5.

### **Hypothèses principales**

Le blocage  $\beta$ 1 adrénérique par Esmolol prévient la survenue de la dysfonction myocardique et vasculaire dans le choc septique expérimental.

La diminution des défaillances cardiovasculaires est secondaire à une régulation des voies de l'inflammation.

### **Objectifs**

Evaluer les effets hémodynamiques sur les fonctions cardiaques et vasculaires de l'adjonction d'esmolol à la phase précoce du choc septique expérimental ;

Evaluer le retentissement inflammatoire systémique, cardiaque et vasculaire de l'adjonction d'esmolol à la phase précoce du choc septique expérimental.

### **Plan expérimental spécifique du travail**

Quatre heures après la réalisation de la CLP, les animaux sont randomisés en cinq groupes qui seront évalués 14 heures plus tard :

- Sham,
- CLP,
- CLP + esmolol réalisé uniquement pour les évaluations de l'inflammation (ELISA, PCR et Western Blot),
- CLP + noradrénaline (débutée à 18 heures durant une heure pour augmenter la pression artérielle de 20%, dose entre 1 et 2  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ),
- CLP + Noradrénaline + esmolol (débuté à 4 heures post CLP, dose fixée à 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ),

$1.\text{min}^{-1}$ ).

Les groupes ont été réalisés à quatre reprises :

- une première fois pour la réalisation de l'hémodynamique par Micro TEP ;
- une seconde fois pour la réalisation des mesures par cathéter de conductance ;
- une troisième fois pour la réalisation de la vasoréactivité et pour les analyses inflammatoires : ELISA sur le sérum, et les PCR, western blot sur le cœur et l'aorte ;
- une quatrième fois pour la survie uniquement pour les groupes CLP et CLP + esmolol.

### Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en médiane [min-max] ou interquartile range. Le seuil de significativité a été fixé à 0.05. Le logiciel utilisé pour la réalisation des tests statistiques est :

- Prism (GraphPad 6.0 Software, San Diego, CA ).

En raison de la taille des échantillons, toutes les analyses ont été réalisées avec des tests non-paramétriques.

Les caractéristiques hémodynamiques des groupes CLP et Sham ont été comparées avec un test de Wilcoxon-Mann-Whitney et celles, globales, entre les groupes CLP, CLP + noradrénaline, CLP + Noradrénaline + esmolol, avec un test de Kruskal Wallis. Un test *post hoc* non-paramétrique de Dunn a été appliqué pour déterminer la significativité intergroupes.

Un test de Friedman a par ailleurs été réalisé pour évaluer la significativité intergroupes de la vasoréactivité.

Enfin, une analyse de Kaplan Meyer a été réalisée pour l'étude de survie.

## Résultats

### Caractérisation du modèle (tableau 1)

La comparaison du groupe CLP avec le groupe Sham permet de mettre en évidence une hypotension artérielle (112 mm Hg [95–147 mm Hg] vs. 97 mm Hg [50–100 mm Hg] ;  $p=0.02$ ) et une hyperlactatémie (1.3 mmol.L<sup>-1</sup> [0.6–2.3 mmol.L<sup>-1</sup>] vs. 3.6 mmol.L<sup>-1</sup> [2.3–4.2 mmol.L<sup>-1</sup>] ;  $p=0.004$ ). Les paramètres d'évaluation de la fonction myocardique dépendant de la charge ne sont pas modifiés dans le groupe CLP comparé au groupe Sham : (fraction d'éjection, 55% [48–67%] vs. 51% [42–66%] ;  $p=0.51$  ; débit cardiaque, 102 mL.min<sup>-1</sup> [76–146 mL.min<sup>-1</sup>] vs. 102 mL.min<sup>-1</sup> [48–141 mL.min<sup>-1</sup>] ;  $p=0.89$  ; le taux d'éjection de pointe, -1.87 s<sup>-1</sup> [-2.28 à -1.29 s<sup>-1</sup>] vs. -1.81 s<sup>-1</sup> [-2.22 à -1.59 s<sup>-1</sup>] ;  $p=0.47$  ; et le taux de remplissage maximal, 2.2 s<sup>-1</sup> [1.67–2.57 s<sup>-1</sup>] vs. 1.69 s<sup>-1</sup> [1.55–2.07 s<sup>-1</sup>] ;  $p=0.09$ ).

L'évaluation de la fonction cardiaque indépendamment de la charge par cathétérisme de conductance retrouve une altération de l'inotropisme dans le groupe CLP par rapport au groupe Sham (1.32 mm Hg.μL<sup>-1</sup> [0.54–1.35 mm Hg.μL<sup>-1</sup>] vs. 5.35 mm Hg.μL<sup>-1</sup> [4.1–5.63 mm Hg.μL<sup>-1</sup>] ;  $p=0.007$ ) (figure 1).

Tableau 1 : Effets hémodynamiques de la ligature et ponction cœcale (CLP) sur la fonction myocardique évaluée par MicroPET

	SHAM		CLP		p
	N=6		N=6		
	Médiane	min-max	Médiane	min-max	
Fréquence cardiaque (min <sup>-1</sup> )	445	428-487	426	384-497	0.33
Pression artérielle moyenne (mmHg)	112	95-147	97	50-100	0.02
Volume de fin de diastole (μl)	442	349-523	434	296-545	0.67
Volume de fin de systole (μl)	190	121-265	193	173-268	0.78
Volume d'éjection systolique (μl)	234	165-330	226	123-345	0.99
Fraction d'éjection (%)	55	48-67	51	42-66	0.51
Débit cardiaque (μl.min <sup>-1</sup> )	102	76-146	102	48-141	0.89
Taux d'éjection de pointe (s <sup>-1</sup> )	-1.87	-2.28- -1.29	-1.81	-2.22- -1.59	0.47
Taux de remplissage maximal (s <sup>-1</sup> )	2.2	1.67-2.57	1.69	1.55-2.07	0.09
Lactatémie (mmol/l)	1.3	0.60-2.3	3.6	2.3-4.2	0.004

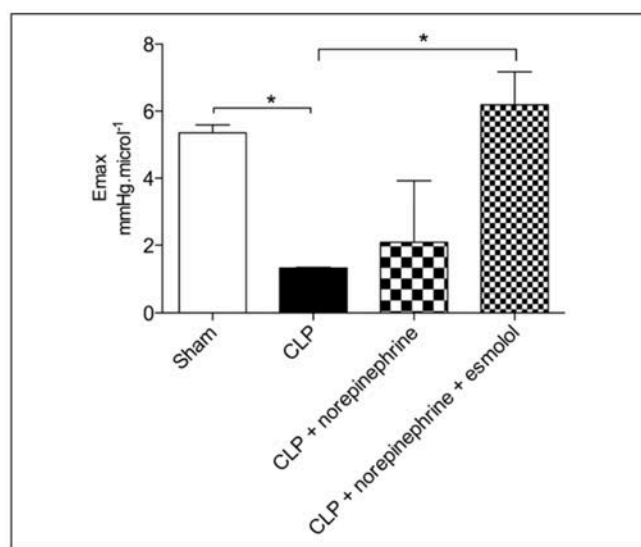


Figure 1 : Comparaison de l'inotropisme cardiaque Emax (n=6) indépendamment des conditions de charge.

La vasoréactivité évaluée au niveau de segments d'artère mésentérique est effondrée dans le groupe CLP par rapport au Sham tant sur le plan de la contraction que sur celui de la relaxation (figure 2).

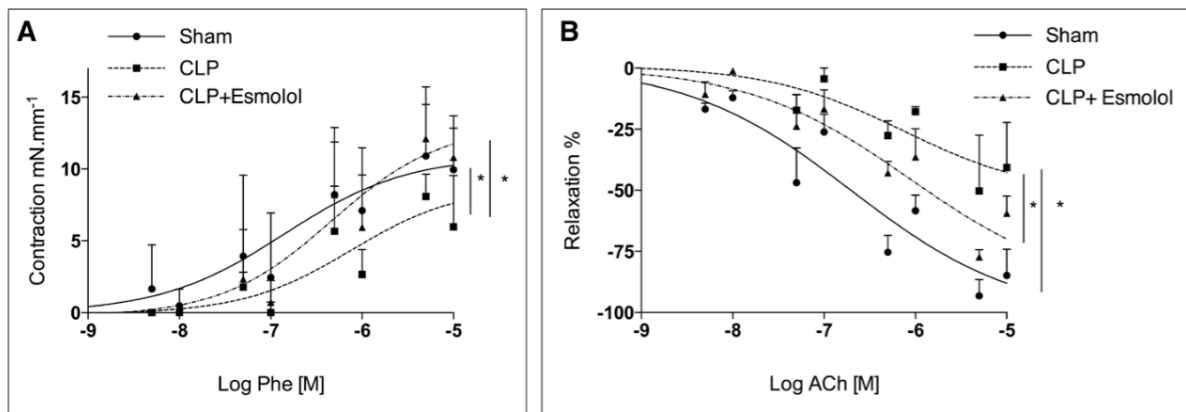


Figure 2 : Vasoréactivité *ex vivo* à la phényléphrine (Phe) et relaxation à l'acétylcholine (ACh)

### Effets hémodynamiques de l'adjonction d'esmolol (tableau 2)

La lactatémie était diminuée dans le groupe CLP + norepinéphrine + esmolol, comparé avec les deux autres groupes (2.1 mmol.L<sup>-1</sup> [1.5–2.7 mmol.L<sup>-1</sup>] vs. CLP: 3.6 mmol.L<sup>-1</sup> [2.3–4.2 mmol.L<sup>-1</sup>] vs. CLP + norépinéphrine: 3.0 mmol.L<sup>-1</sup> [1.7–4.4 mmol.L<sup>-1</sup>];  $p = 0.04$ ).

*Effets Cardiaques.* La fréquence cardiaque était diminuée dans le groupe CLP + norépinéphrine + esmolol comparé avec les deux autres groupes non-traités (369 min<sup>-1</sup> [331–394 min<sup>-1</sup>] vs CLP: 426 min<sup>-1</sup> [384– 497 min<sup>-1</sup>] vs. CLP + norépinéphrine : 445 min<sup>-1</sup> [342–541 min<sup>-1</sup>] ;  $p = 0.02$ ). A l'inverse, la pression artérielle tend à augmenter dans les deux groupes traités avec la norépinéphrine en comparaison avec le groupe CLP (CLP + norépinéphrine + esmolol : 101mm Hg [90–107mm Hg] vs. CLP + norépinéphrine : 111mm Hg [81–124mm Hg] vs. CLP: 97mm Hg [50–100mm Hg];  $p = 0.09$ ). Le débit cardiaque n'était pas significativement diminué par l'adjonction d'esmolol (CLP + norépinéphrine + esmolol : 113 mL.min<sup>-1</sup> [101–131 mL.min<sup>-1</sup>] vs. CLP + norépinéphrine : 118 mL.min<sup>-1</sup> [89–236 mL.min<sup>-1</sup>] vs. CLP : 102 mL.min<sup>-1</sup> [48–141 mL.min<sup>-1</sup>] ;  $p=0.22$ ). Le volume d'éjection systolique était quant à lui significativement augmenté dans le groupe CLP + norépinéphrine + esmolol en comparaison avec les autres groupes (305  $\mu$ L [279–

375  $\mu\text{L}$ ] vs. CLP + norépinéphrine : 274  $\mu\text{L}$  [230–438  $\mu\text{L}$ ] vs. CLP: 226  $\mu\text{L} \pm$  [123–345  $\mu\text{L}$ ];  $p = 0.04$ ).

L'évaluation de l'inotropisme indépendamment de la charge par le paramètre Emax montre une amélioration de la contractilité myocardique dans le groupe traité par esmolol comparé au groupe CLP (6.2mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$  [3.93–7.72 mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$ ] vs CLP: 1.32 mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$  [0.54– 1.35 mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$ ] vs CLP + norépinéphrine: 2.09 mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$  [1.25–5 mm Hg. $\mu\text{L}^{-1}$ ];  $p = 0.001$ ) (figure 1).

*Effets Vasculaires.* La vasoréactivité à la phényléphrine *ex vivo* des artères mésentériques était restaurée dans ce modèle expérimental par l'adjonction d'esmolol alors que la relaxation à l'acétylcholine n'était pour sa part que partiellement améliorée (figure 2)

Tableau 2 : comparaison des caractéristiques hémodynamiques à 18 heures de la CLP par système MicroPET

	CLP		CLP + norepinéphrine		CLP + norepinéphrine + esmolol		p
	n=6		n=6		n=6		
	Médiane	min-max	Médiane	min-max	Médiane	min-max	
Fréquence cardiaque ( $\text{min}^{-1}$ )	426	384-497	445	342-541	369 <sup>a</sup>	331-394	0.02
Pression artérielle moyenne (mmHg)	97	50-100	111	81-124	101	90-107	0.09
Volume de fin de diastole ( $\mu\text{l}$ )	434	296-545	444	397-759	500	400-551	0.6
Volume de fin de systole ( $\mu\text{l}$ )	193	173-268	187	122-321	195	119-221	0.82
Volume d'éjection systolique ( $\mu\text{l}$ )	226	123-345	274	230-438	305 <sup>b</sup>	279-375	0.04
Fraction d'éjection (%)	51	42-66	67 <sup>c</sup>	57-70	64 <sup>b</sup>	58-69	0.01
Débit cardiaque ( $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ )	102	48-141	118	89-236	113	101-131	0.22
Taux d'éjection de pointe ( $\text{s}^{-1}$ )	-1.81	-2.22- -1.59	-2.03	-2.34- -1.74	-2.1	-2.38- -1.85	0.09
Taux de remplissage maximal ( $\text{s}^{-1}$ )	1.69	1.55-2.07	1.95	1.24-2.68	2.29	2.03-2.63	0.04
Dose de norepinéphrine ( $\text{microg}.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )			1.3	1-2	1.2	0.4-1.5	0.40
Lactatémie (mmol/l)	3.6	2.3-4.2	3.0	1.7-4.4	2.1 <sup>b</sup>	1.5-2.7	0.04

<sup>a</sup>CLP + norépinéphrine *versus* CLP + norépinéphrine + esmolol ; <sup>b</sup>CLP + norépinéphrine + esmolol *versus* CLP; et <sup>c</sup>CLP *versus* CLP + norépinéphrine.

### Effets du blocage $\beta$ 1 adrénergique sur la survie (figure 3)

L'esmolol augmentait la durée médiane jusqu'au décès de 10 heures par rapport aux animaux CLP non-traités (log rank test;  $p = 0.0002$ ). Dix-huit heures après la CLP, le taux de mortalité était de 13/15 dans le groupe CLP et 6/15 dans le groupe esmolol.

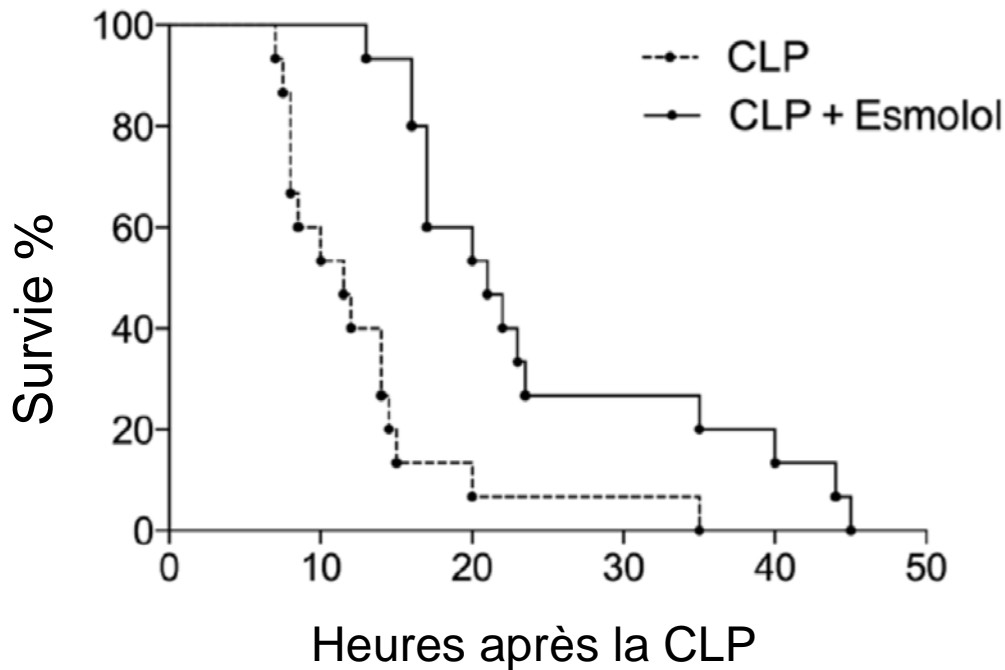


Figure 3 : Courbe de survie. L'esmolol est débuté 4 heures après la réalisation de la CLP.

( $n = 15$  rats par groupe;  $p < 0.0002$ ; log rank test).

### Effets de l'Esmolol sur les médiateurs systémiques de l'inflammation

#### (figure 4)

Comparé au groupe CLP, l'adjonction d'esmolol promeut la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-1ra, IL-10, et IP-10) et diminue la synthèse des cytokines de l'inflammation (IL-1 $\alpha$ , IL-2, et IL-6).

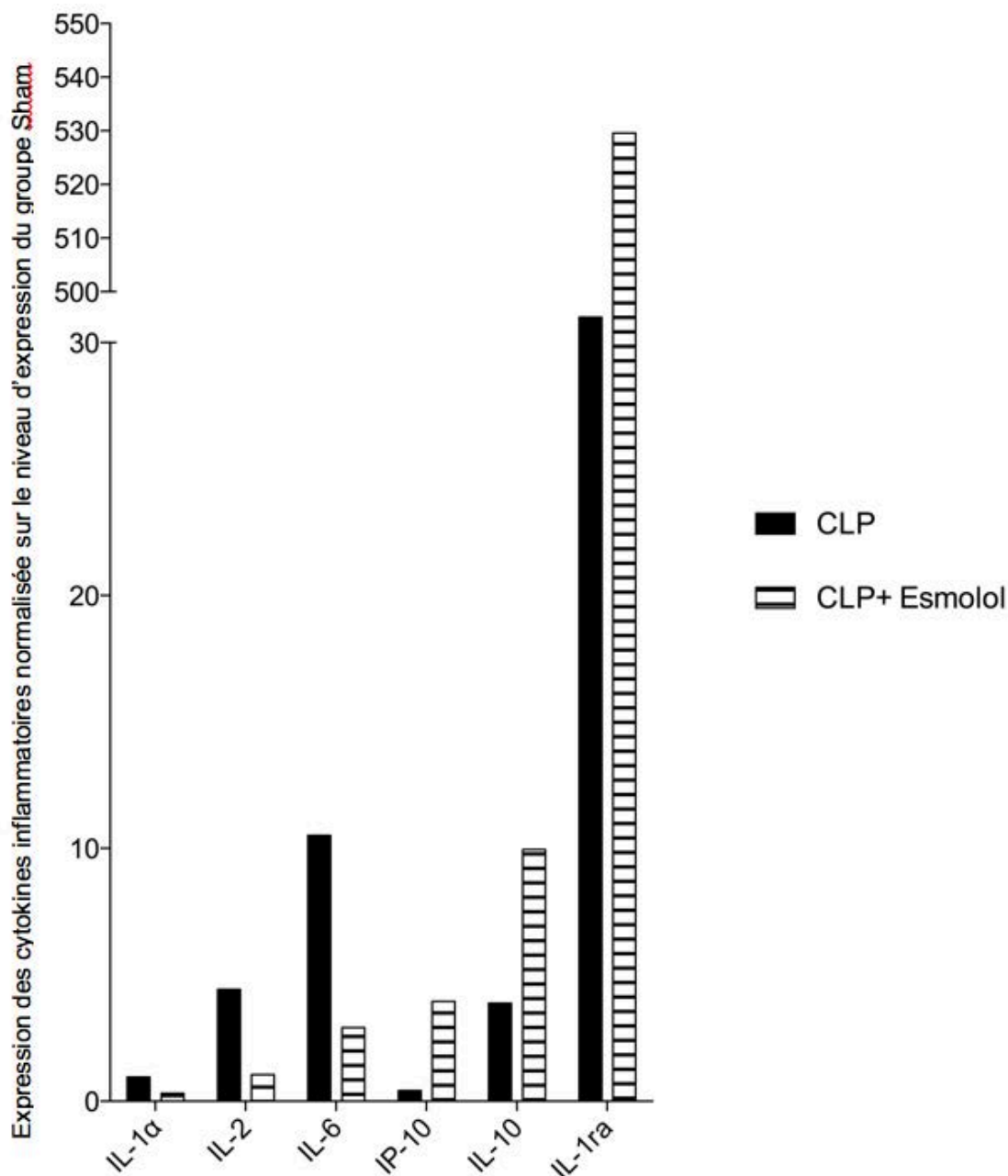


Figure 4 : Expression des médiateurs de l'inflammation dans le plasma des animaux du groupe CLP et CLP + esmolol, normalisée sur les niveaux d'expression du Sham. Les plasmas des animaux ont été poolés par groupe. N=5 par groupe.

### Modulation de l'inflammation sur le tissu myocardique et vasculaire aortique

*Myocarde (figure 5).* Les animaux du groupe CLP présentait une augmentation de l'expression de la protéine iNOS au niveau du tissu myocardique. Ce niveau était



significativement réduit dans le groupe CLP + esmolol ( $p < 0.05$ ). Le ratio phospho-Akt sur Akt était diminué dans le groupe CLP sans être significativement augmenté par l'adjonction d'Esmolol. Le choc septique, induit par la CLP, diminuait significativement le ratio de phospho-eNOS sur eNOS ( $p < 0.05$ ). Néanmoins, ce ratio était restauré par l'adjonction d'esmolol ( $p < 0.05$ ). L'expression de NF- $\kappa$ B phosphorylé était significativement augmentée dans le groupe CLP comparé au groupe Sham ( $p < 0.05$ ). Un traitement par esmolol modérait significativement cette expression ( $p < 0.05$ ). L'adjonction d'esmolol n'apportait pas de modification significative de l'expression protéique de p38MAPK, pJnk/Jnk, Caspase 8 et Caspase 3 ( $p > 0.05$ ). L'expression de p53 était significativement diminuée dans le groupe esmolol par rapport au groupe CLP ( $p < 0.05$ ).

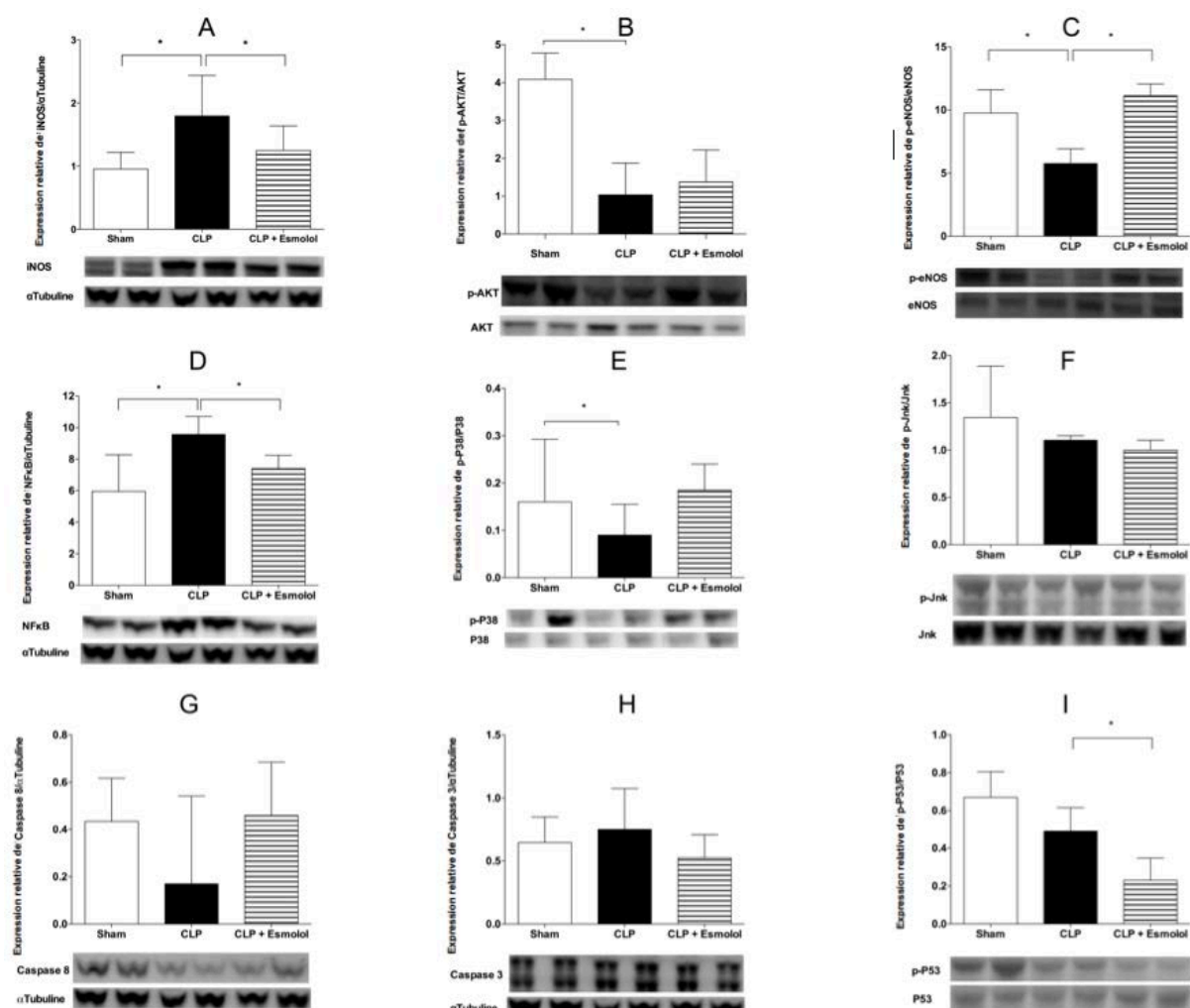


Figure 5 : Expression protéique sur le tissu myocardique. Inducible nitric oxide (iNOS) (A), p-AKT (B), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (C), phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (D), phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase (p-p38) (E), phosphorylated Jun amino-terminal kinase (p-JNK) (F), caspase 8 (G), caspase 3 (H), et protéine tumorale p53 (P53) (I). n=6 par groupe. \* p<0.05

*Aorte.* Les modifications de l'expression des protéines iNOS, eNOS, pAkt/Akt et NF- $\kappa$ B phosphorylé sont identiques à celles observées dans le cœur (figure 6) (voir le supplément en annexe 5).

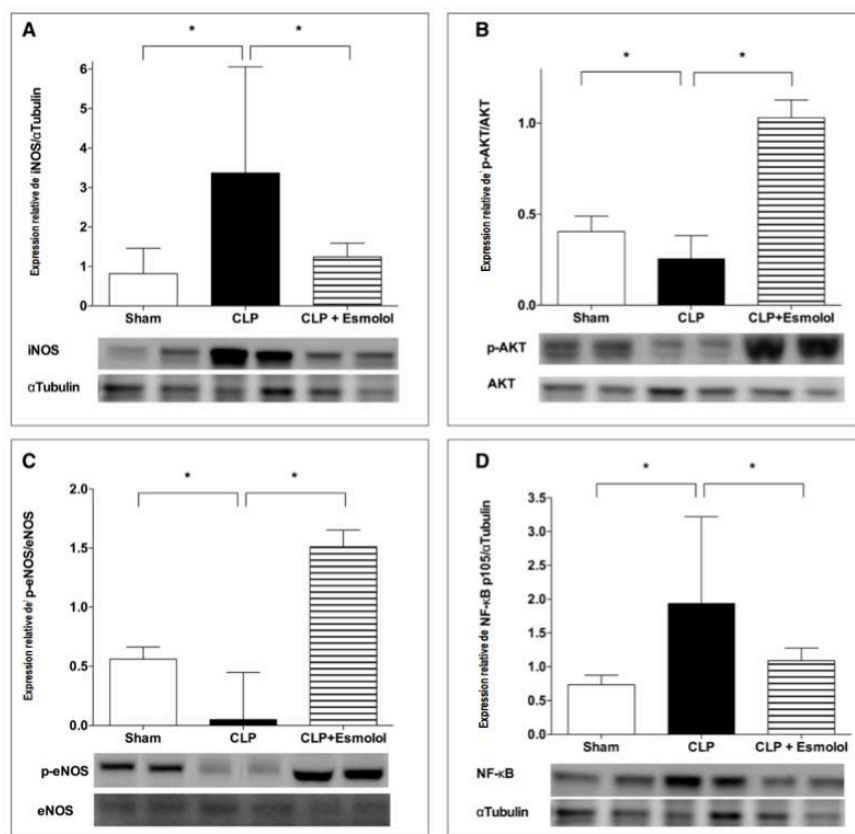


Figure 6 : Expression protéique sur le tissu aortique évaluée par Western Blot pour iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (A), pAkt/Akt (B), eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) (C), NF- $\kappa$ B (phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B) (D). N= 6 par groupe. \* p<0.05.

### Modulation adrénergique suivant l'administration d'esmolol (figure 7)

L'expression des adrénorécepteurs  $\alpha 1$  était significativement diminuée sur les vaisseaux aortiques par le choc septique à la fois en expression d'ARNm et protéique. L'adjonction d'esmolol restaure partiellement l'expression des adrénorécepteurs  $\alpha 1$ .

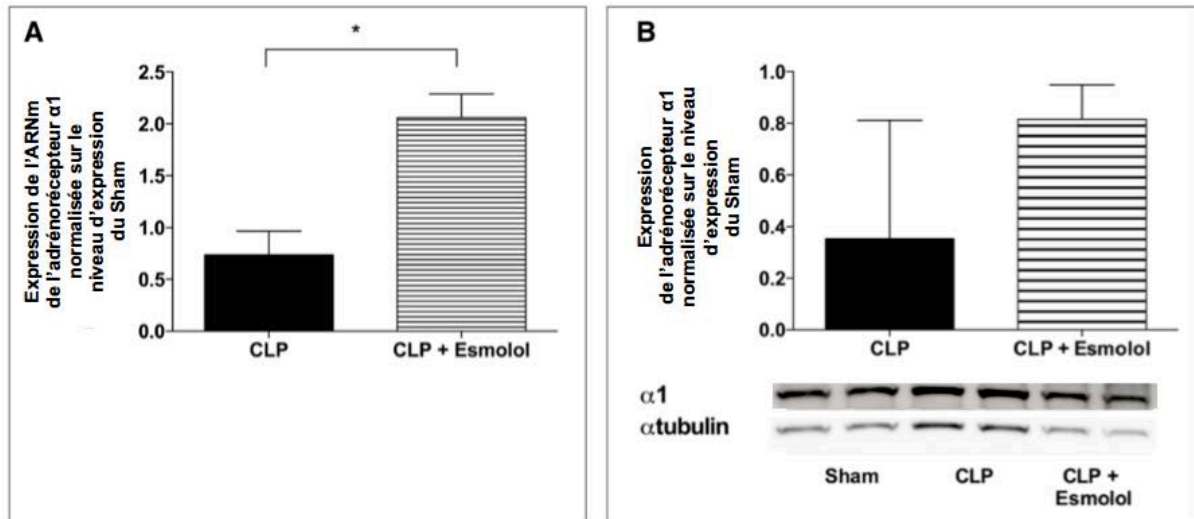


Figure 7 : Expression en ARNm et protéique des adrénorécepteurs  $\alpha 1$  normalisée sur le niveau d'expression du Sham. N = 5 par groupe.

## **Travail 2 : L'inhibition du canal *if* par l'ivabradine n'est pas associée à l'amélioration des fonctions cardiaque et vasculaire dans le choc septique expérimental. Annexe 6**

### **Hypothèses principales**

Malgré une réanimation adaptée, certains patients en choc septique présentent une tachycardie persistante qui est le stigmate d'un certain degré de dysautonomie centrale. Les effets des  $\beta$  bloquants dans le choc septique, à la phase initiale, sont une réduction de la fréquence cardiaque et de l'inflammation systémique, cardiaque et vasculaire. Néanmoins, on ne connaît pas l'impact de la réduction de la fréquence cardiaque dans la diminution du processus inflammatoire. L'ivabradine est une molécule qui inhibe sélectivement le canal *if* au niveau du nœud sinusal, entraîne une réduction de la fréquence cardiaque et présente peu d'effets anti-inflammatoires en situation aiguë.

### **Objectifs**

Evaluer l'impact d'une réduction isolée de la fréquence cardiaque sur la fonction cardiaque et sur la fonction vasculaire dans un modèle de choc septique expérimental.

Evaluer l'impact de cette réduction isolée de la fréquence cardiaque sur l'inflammation tissulaire cardiaque et vasculaire aortique.

### **Plan expérimental spécifique du travail**

Quatre heures après la réalisation de la CLP, les animaux sont randomisés en trois groupes qui seront évalués 14 heures plus tard :

- Sham,
- CLP,
- CLP + ivabradine,

Il a été réalisé à 18 heures de la chirurgie :

- une évaluation hémodynamique échocardiographique,

- une évaluation de la vasoréactivité sur banc de myographie,
- une évaluation de l'inflammation tissulaire cardiaque et vasculaire aortique.

## Statistiques

Tous les résultats sont exprimés en médiane [min-max] et intervalle de confiance à 95% pour la médiane en utilisant une technique de bootstrap non-paramétrique avec un nombre de ré-échantillonnage égal à 1000. Les figures présentent la médiane et le 75<sup>ème</sup> percentile de l'interquartile range. Le seuil de significativité a été fixé à 0.05. Les logiciels utilisés pour la réalisation des graphiques et des tests statistiques sont :

- Prism (GraphPad 6.0 Software, San Diego, CA ),
- IBM-SPSS Statistics 22.0 (IBM corp).

En raison de la taille des échantillons, toutes les analyses ont été réalisées avec des tests non-paramétriques.

Les variables hémodynamiques ont été comparées globalement par un test de Kruskal-Wallis. En cas de significativité, un test *post hoc* non-paramétrique de Dunn a été appliqué pour déterminer la significativité entre deux groupes pré-spécifiés : 1/ Sham et CLP et 2/CLP et CLP + ivabradine.

Un test de Friedman a par ailleurs été réalisé pour évaluer la significativité intergroupes de la vasoréactivité.

## Résultats

### Détermination de la dose d'ivabradine nécessaire pour réduire la fréquence cardiaque de 20% chez le rat en choc septique par CLP

L'objectif était de réduire la fréquence cardiaque d'environ 20% à 18 heures de la réalisation de la CLP. Aucune donnée n'a été publiée sur les modalités d'administration de l'ivabradine dans le choc septique expérimental chez le rat. Nous avons donc réalisé une étude préliminaire chez 20 rats contrôles randomisés en cinq groupes afin de déterminer le dosage adéquat d'ivabradine pour obtenir une réduction de la fréquence cardiaque de 20%. Les rats dans chaque groupe recevaient par gavage un dosage différent d'ivabradine : 0, 0.3, 0.6, 1 et 5 mg.kg<sup>-1</sup>. La fréquence cardiaque était mesurée en utilisant le système d'analyse BP 2000 (Visitech Systems, Apex, USA) à 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 et 18 heures. Cinq mg.kg<sup>-1</sup> permettaient d'obtenir une réduction maximale médiane de la fréquence cardiaque de 27% [25-28] et minimale de 13% [8-21] sur la période de 18 heures (figure 1).

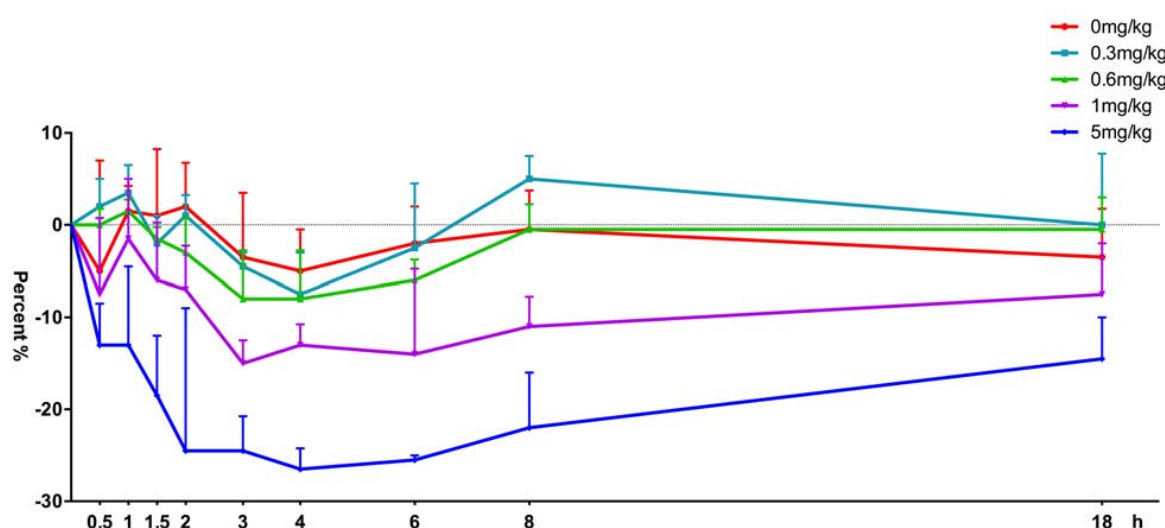


Figure 1 : Courbe dose réponse après l'administration d'ivabradine chez le rat sain. N= 4 par groupe. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction par rapport à la fréquence du temps 0. Les résultats sont exprimés en médiane et le 75<sup>e</sup> percentile de l'interquartile.

Pour déterminer le moment idéal d'administration par rapport à la péritonite, ce dosage était administré à 20 rats randomisés en quatre groupes à trois temps différents : CLP sans ivabradine, 3 heures avant la réalisation de la CLP, au moment de la CLP et quatre heures après la CLP. La fréquence cardiaque était calculée à 18 heures de la réalisation de la CLP par échocardiographie selon les formules pré-spécifiées dans la partie méthodologie. Cinq mg.kg<sup>-1</sup> administrés quatre heures après la réalisation de la CLP permettaient une réduction de la fréquence cardiaque de 22% (figure 2). Il s'agissait de la posologie choisie pour la suite de ce travail.

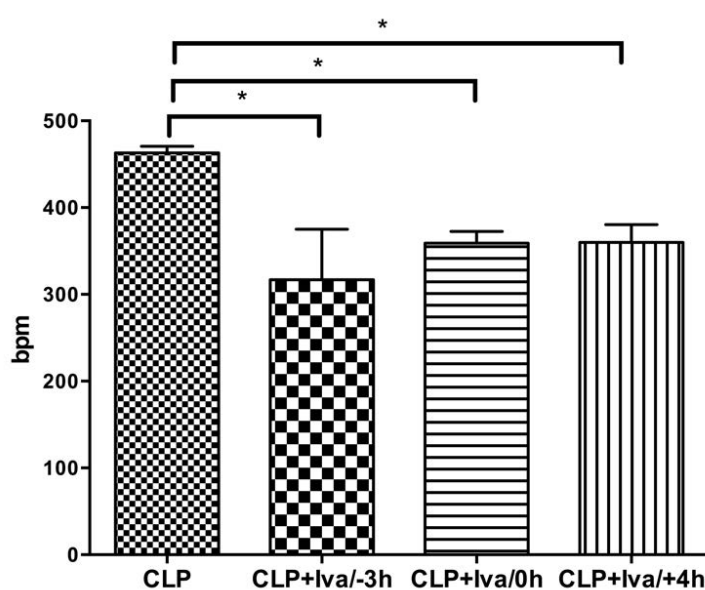


Figure 2: Fréquence cardiaque à 18 heures de la CLP en fonction du moment d'administration de l'ivabradine. CLP+Iva/-3h : Administration 3 heures avant le CLP, CLP+Iva/0h : Administration au moment de la CLP, CLP+Iva/+4h : Administration 4 heures après la CLP. Les résultats sont exprimés en médiane avec le 75<sup>e</sup> percentile de l'interquartile. \*p<0.05.

### Caractérisation du modèle (tableau 1)

Les animaux CLP présentait une tachycardie (Sham : 369 bpm [349-418] vs. CLP : 425 bpm [402-467] ; p=0.053), une hypotension artérielle (Sham : 109 mmHg [104-120] vs. CLP : 80 mmHg [75-96] ; p=0.009) et une hyperlactatémie (Sham : 1.3 mmol.l<sup>-1</sup> [0.8-1.7]

vs. CLP : 2.4 mmol.l<sup>-1</sup> [1.9-3.3] ; p=0.004). L'évaluation de la fonction cardiaque dans le groupe CLP par rapport au Sham retrouvait une diminution du volume d'éjection systolique (Sham : 253 µL [199-302] vs. CLP: 127 µL [71-186] ; p=0.007) et du débit cardiaque (Sham : 92 ml.min<sup>-1</sup> [75-112] vs. CLP : 54 ml.min<sup>-1</sup> [30-77] ; p=0.024).

L'évaluation de la vasoréactivité des artères mésentériques et aortiques sur banc de myographie mettait en évidence, dans le groupe CLP par rapport au groupe Sham, une altération d'une part de la vasoconstriction aux doses croissantes de phényléphrine (p<0.05) et d'autre part de la relaxation à l'acétylcholine (p<0.05) (Figure 3).

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques hémodynamiques 18 heures après la réalisation de la CLP. A : Sham vs. CLP, b : CLP vs. CLP + ivabradine

Variables	Sham n=8			CLP n=8			CLP+ivabradine n=8			Post hoc p	p
	Médiane	Minimum- Maximum IQR	Médiane 95%CI	Médiane	Minimum- Maximum IQR	Médiane 95%CI	Médiane	Minimum- Maximum IQR	Médiane 95%CI		
Fréquence cardiaque (min <sup>-1</sup> )	369	349-418 47.5	355-413	425	402-467 38	415-450	343 <sup>b</sup>	269-368 74	284-368	0.0002	0.0001: CLP vs CLP+ivabradine
Pression artérielle moyenne (mmHg)	109	104-120 15	105-120	80 <sup>a</sup>	75-96 8	75-83	75	58-87 18	64-84	0.0003	0.009: Sham vs CLP
Volume d'éjection systolique (µl)	253	199-302 68	214-280	127 <sup>a</sup>	71-186 69	95-170	105	61-195 58	76-126	0.0004	0.007: Sham vs CLP
Débit cardiaque (ml.min <sup>-1</sup> )	92	75-112 22	87-107	54 <sup>a</sup>	30-77 25	44-72	33	16-72 23	25-45	0.0002	0.024: Sham vs CLP
Fraction d'éjection (%)	87	84-89 4	84-88	91 <sup>a</sup>	87-98 9	87-96	92	83-99 10	85-95	0.0568	
Lactatémie (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.3	0.8-1.7 0.6	0.8-1.5	2.4 <sup>a</sup>	1.9-3.3 0.9	2.0-3.0	2.5	2.0-3.7 1.2	2.2-3.1	0.0004	0.004: Sham vs CLP



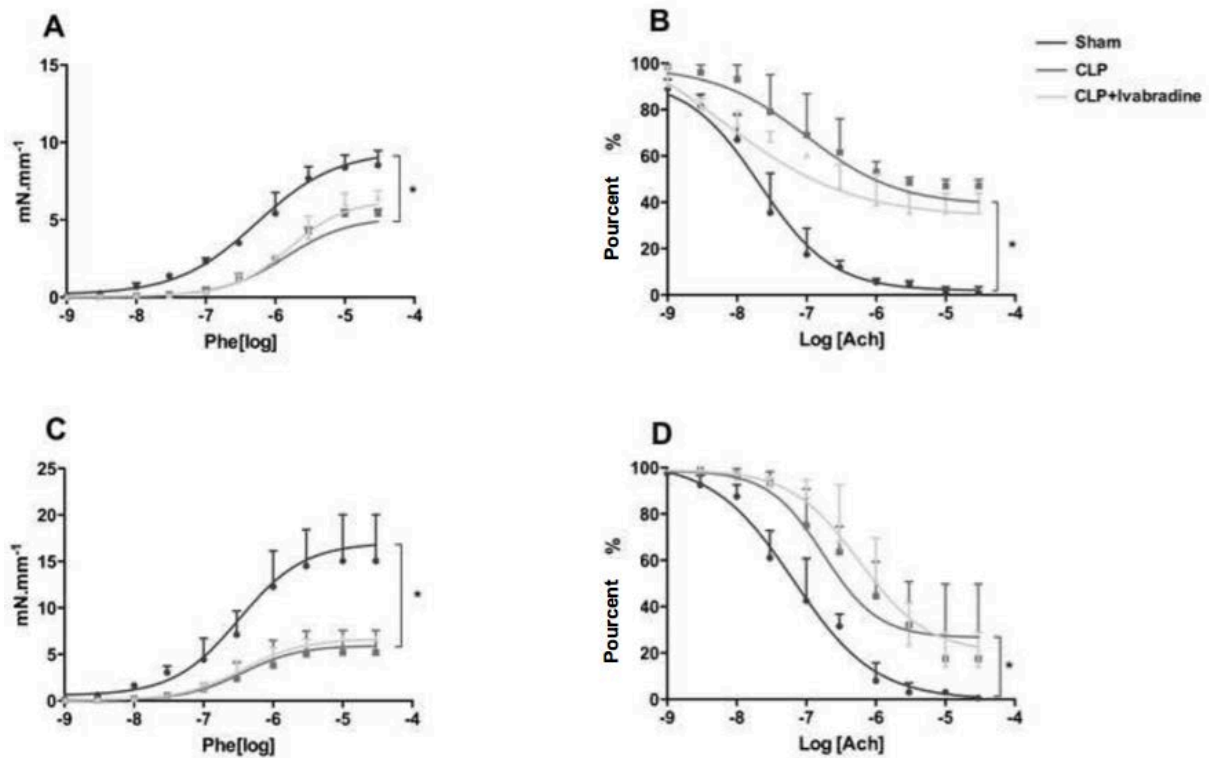


Figure 3 : Vasoactivité *ex vivo* sur banc de myographie de segments d'aorte et d'artères mésentériques. N=8 par groupe. Panels A et C : Vasoconstriction à des doses croissantes de phényléphrine (Phe) exprimé en logarithme de concentration de phényléphrine. Panels B et D : Relaxation des vaisseaux en fonction de doses croissantes d'acétylcholine (Ach). Les symboles représentent la médiane et les barres d'erreur le 75<sup>ème</sup> percentile de l'interquartile de chaque groupe. \* p<0.05.

### Effets hémodynamiques de l'adjonction d'ivabradine

L'adjonction d'ivabradine entraînait une réduction de la fréquence cardiaque en comparaison avec les animaux CLP (CLP : 425 bpm [402-467] vs. CLP+ivabradine : 343 bpm [269-368] ; p=0.0001). Néanmoins, aucun effet hémodynamique n'était retrouvé par rapport au groupe CLP sur la pression artérielle moyenne (CLP : 80 mmHg [75-96] vs. CLP+ivabradine : 75 mmHg [58-87] ; p>0.05), le volume d'éjection systolique (CLP : 127µL [71-186] vs. CLP+ivabradine : 105 µL [61-195] ; p>0.05), l'évolution de la lactatémie (CLP : 2.4 mmol.l<sup>-1</sup> [1.9-3.3] vs. CLP+ivabradine : 2.5 mmol.l<sup>-1</sup> [2.0-3.7] ; p>0.05). Proportionnellement à la diminution de la fréquence cardiaque, le débit

cardiaque était diminué de façon non-significative par rapport au groupe CLP (CLP : 54 ml.min<sup>-1</sup> [30-77] vs. CLP+ivabradine: 33 ml.min<sup>-1</sup> [16-72] ; p>0.05).

La réduction de la fréquence cardiaque avec de l'ivabradine n'entraînait aucun effet sur la vasoréactivité à la phényléphrine et à l'acétylcholine à la fois sur les vaisseaux aortique et mésentériques (p>0.05) (Figure 3, Panels A, B, C et D).

#### **Effets inflammatoires systémiques de l'adjonction d'esmolol (figure 4)**

Comparé au groupe Sham, le choc septique par CLP entraîne une élévation significative des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-10 (p<0.05). L'adjonction d'ivabradine ne modifie en rien les taux de cytokines circulantes.

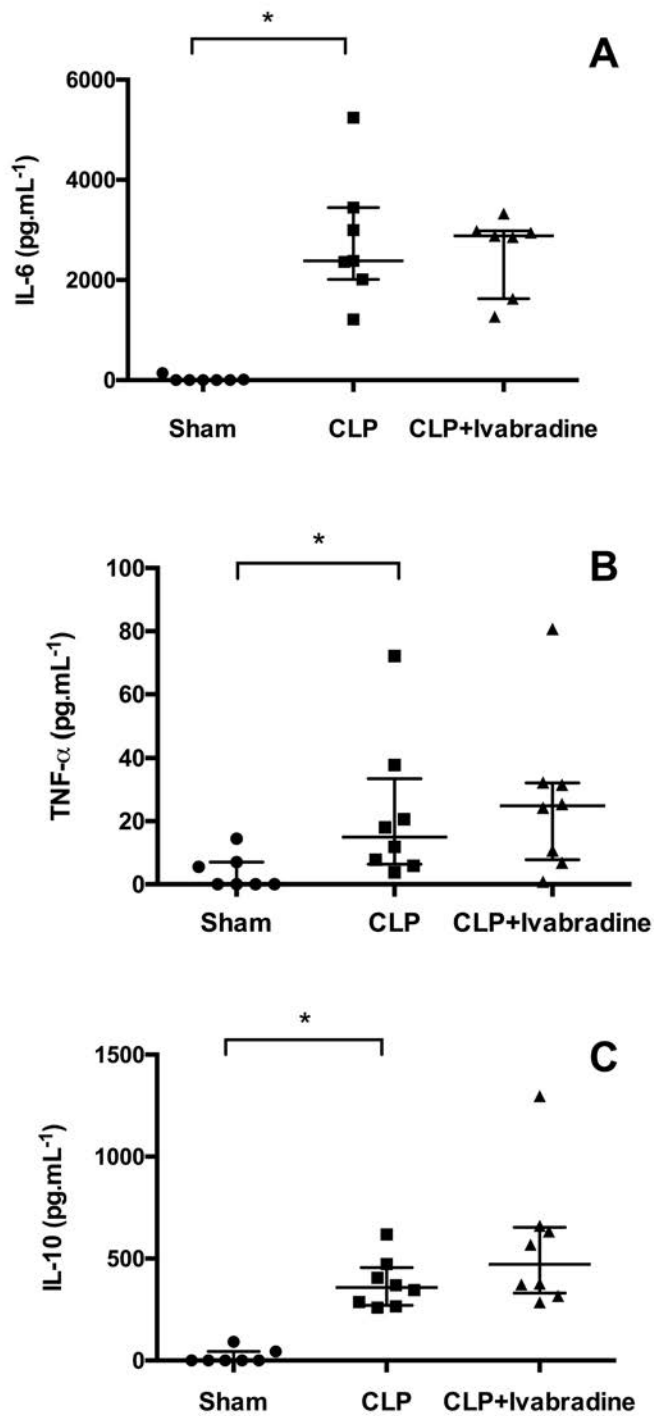


Figure 4 : Taux circulants de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) et IL-10 (C). Les données sont exprimées en (pg.ml<sup>-1</sup>). Les données sont exprimées en médiane et interquartile range. Sham, n=7 ; CLP, n=8 ; CLP+ivabradine, n=8. Pour IL6 à la fois dans les groupes CLP et CLP+ ivabradine, une valeur dans chaque groupe sort des gammes et a donc été exclue de l'analyse statistique. \* Sham vs. CLP, P < 0.05. CLP : cecal ligation and puncture.

## Effets inflammatoires de l'ivabradine sur les tissus cardiaque et vasculaire

(figures 5 et 6)

Tant sur le cœur que sur l'aorte thoracique, comparativement au Sham, le sepsis entraîne une élévation significative du niveau d'expression de iNOS, et de p-NFκB-p65 tandis que les ratios d'IκBα, p-eNOS/eNOS et de p-Akt/Akt sont diminués ( $p < 0.05$ ). Le traitement par ivabradine n'influence en rien ce profil inflammatoire ( $p > 0.05$ ).

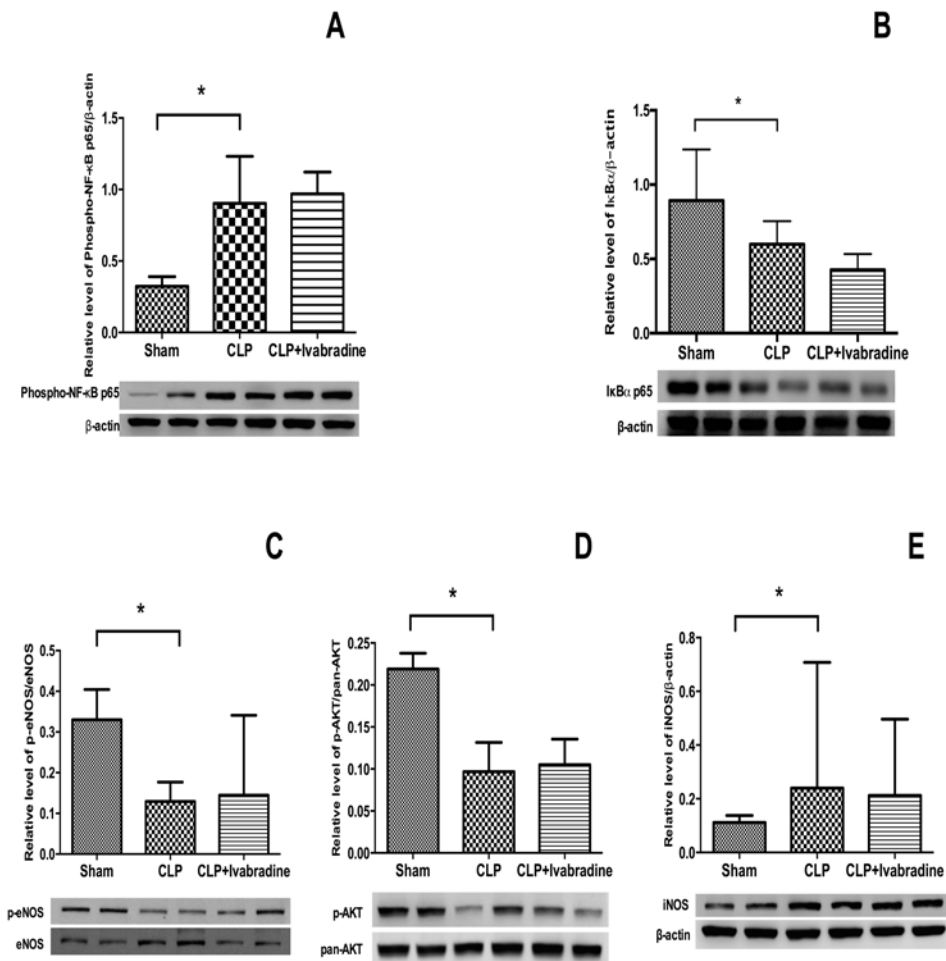


Figure 5 : Niveau d'expression des protéines des voies de l'inflammation évalué par Western Blot sur le tissu myocardique. \* $p < 0.05$ .  $n = 8$  par groupe. A : NF-κB (phosphorylated nuclear factor-κB), (B) nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IκBα), (C) phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), (D) phosphorylated Akt (p-AKT) et (E) inducible nitric oxide

synthase (iNOS). Le taux protéine/  $\beta$ -actine est calculé à partir d'une méthode densitométrique.

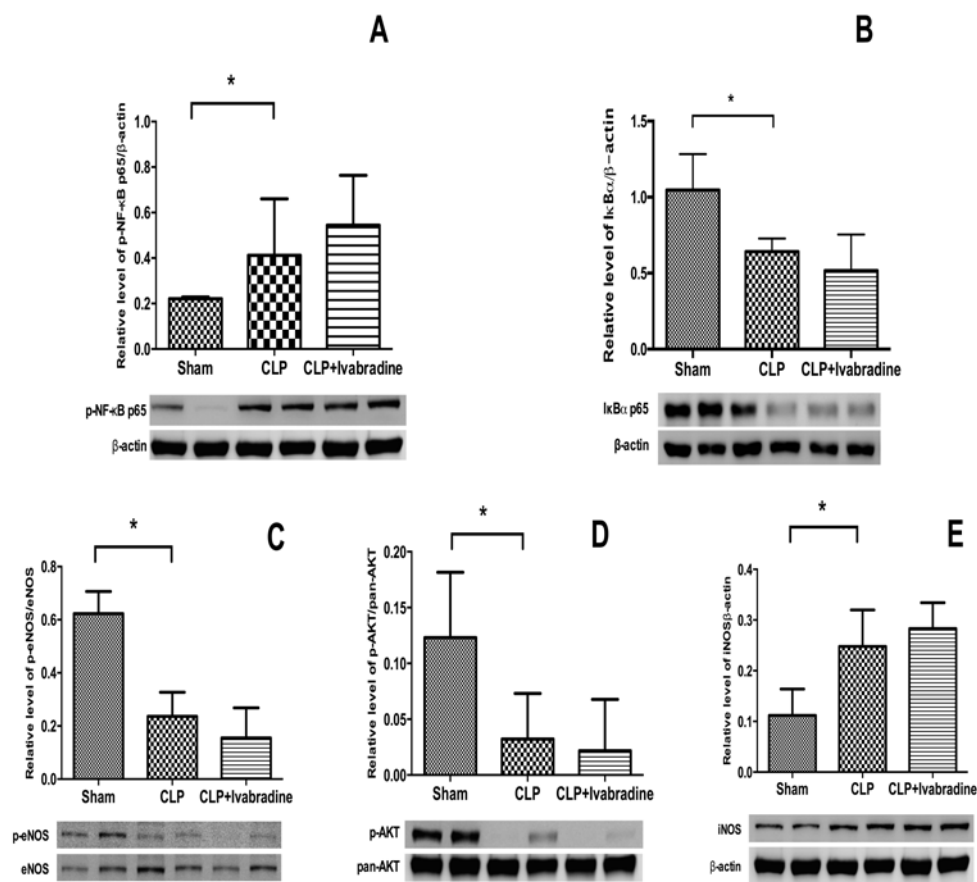


Figure 6 : Niveau d'expression des protéines des voies de l'inflammation évalué par Western Blot sur le tissu vasculaire aortique. \* $p < 0.05$ .  $n = 8$  par groupe. A : NF- $\kappa$ B (phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B), (B) nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ), (C) phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), (D) phosphorylated Akt (p-AKT) et (E) inducible nitric oxide synthase (iNOS). Le taux protéine/  $\beta$ -actine est calculé à partir d'une méthode densitométrique.

## **Travail 3 : Effets anti-inflammatoire et cardioprotecteur de l'esmolol dans le choc septique. Etude ESMOSEPSIS. Annexe 7.**

### **Contexte**

Un premier essai clinique de phase II a montré que l'adjonction d'esmolol dans les 24 premières heures de la prise en charge de patients en choc septique était associée à une réduction efficace de la fréquence cardiaque avec une excellente tolérance sur le plan hémodynamique par rapport à un groupe de patients identiques traités avec un placebo. Néanmoins, plus de 40% des patients dans les deux groupes recevaient du levosimendan, un calcium sensibilisateur inotrope positif. Qui plus est, la population-contrôle était systématiquement, même si de façon non significative, plus sévère. Enfin, la mortalité du groupe contrôle était étonnamment élevée, à près de 80%, en comparaison de la mortalité habituellement retrouvée dans les essais cliniques (autour de 20 à 30%) [299]. En conséquence, il existe un réel manque de données hémodynamiques et métaboliques sur les effets d'un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques tel que l'esmolol chez des patients en choc septique à la phase initiale.

### **Hypothèse principale**

Décrire et comparer la valeur moyenne de l'index cardiaque avant/après l'administration d'esmolol, titré pour une baisse de 20 % de la fréquence cardiaque chez des patients en état de choc septique.

### **Méthodologie**

La partie méthodologie est décrite *in extenso* dans l'annexe 7.

## Etat d'avancement du travail

A la date du 10 janvier 2016, 8/25 patients ont été inclus dans l'étude. Afin d'améliorer le taux d'inclusion, un deuxième centre vient d'être ouvert à Lille.

## Discussion

### Résultats principaux

Les résultats principaux de ces deux études expérimentales sont que durant le choc septique expérimental :

- 1/ le blocage  $\beta_1$  adrénergique par esmolol réduit significativement la fréquence cardiaque, améliore l'inotropisme cardiaque *in vivo* et la vasoréactivité *ex vivo* ;
- 2/ ces effets hémodynamiques semblent en partie être secondaires à une diminution de l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B au niveau du cœur et des vaisseaux ;
- 3/ l'adjonction d'esmolol est associée à une augmentation de la transcription du gène du récepteur  $\alpha_1$  adrénergique ;
- 4/ la réduction isolée de la fréquence cardiaque par un agent médicamenteux tel que l'ivabradine n'est associée à aucune amélioration sur la fonction cardiaque explorée par échocardiographie *in vivo* et sur la vasoréactivité *ex vivo* ;
- 4/ la réduction isolée de la fréquence cardiaque n'entraîne aucune modification sur les cytokines suivantes IL6, IL10 et TNF $\alpha$  sur les voies de l'inflammation testées et en particulier NF- $\kappa$ B.

### Intérêt du modèle

Il s'agit d'un modèle de choc septique par ligature et ponction cœcale qui est délibérément sévère. En effet, dans le premier travail, tous les rats décèdent d'un choc réfractaire. Ce modèle est réanimé en se rapprochant des recommandations humaines. Ainsi, après la réalisation de la chirurgie, les rats sont laissés au repos pendant quatre heures, le temps de l'apparition d'un sepsis. Les rats étant perfusés par une voie veineuse centrale tunnélisée, les traitements sont débutés à partir de la quatrième heure. Ces traitements comportent, outre le traitement expérimental, comme pour la prise en charge d'un sepsis sévère chez l'homme, une antibiothérapie efficace et une expansion volémique conséquente. Dans notre modèle, les rats recevaient 10 ml.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pendant 14



heures, ce qui représente chez un homme de 70 kg, un apport hydrique d'environ 10 l sur 14 heures. Ce modèle est évalué à la 18<sup>e</sup> heure de la réalisation de la chirurgie. Dans les deux travaux, on retrouvait une altération de la fonction cardiaque *in vivo* et de la vasoréactivité *ex vivo* au niveau des artères mésentériques. Néanmoins, même si les conditions de réalisation du modèle sont identiques entre les deux études, le premier travail retrouvait un débit cardiaque maintenu alors que ce dernier s'abaissait significativement dans le deuxième travail. Cette diminution du débit cardiaque peut être attribuée à un certain degré d'hypovolémie malgré le remplissage important qui avait été effectué. Logiquement, les marqueurs de l'inflammation systémique cytokinique étaient élevés suite à la ligature et à la ponction cœcale. Les voies de l'inflammation testées et en particulier l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B étaient augmentées dans les suites du choc septique au niveau des tissus cardiaque et vasculaire aortique dans les deux travaux. Ces résultats reproduisent plusieurs travaux antérieurement publiés [311, 313].

### **Effets hémodynamiques du blocage $\beta$ 1 adrénergique**

Comme dans les travaux antérieurs à la fois expérimentaux et cliniques, l'adjonction d'un  $\beta$ 1 bloquant est associée à une excellente tolérance hémodynamique. En effet, malgré une réduction efficace de la fréquence cardiaque, le débit cardiaque n'est pas significativement diminué [287, 289, 290]. Une explication fréquemment retrouvée est que, en parallèle de la réduction de la fréquence cardiaque, la durée de la diastole s'allonge, permettant ainsi un meilleur remplissage ventriculaire gauche et atténuant par là même la diminution du débit cardiaque. Qui plus est, l'adjonction d'esmolol est associée à une amélioration de la contractilité intrinsèque évaluée par cathéter de conductance, confirmant ainsi un travail antérieur réalisé sur cœur isolé perfusé [287].

Théoriquement, le blocage  $\beta$ 1 adrénergique sélectif n'est pas associé à des effets vasculaires directs. En effet, les  $\beta$ 1 adrénorécepteurs sont normalement peu ou pas

exprimés à la surface des vaisseaux. Néanmoins, nous avons retrouvé que l'adjonction d'esmolol d'une part, ne modifiait pas la pression artérielle moyenne et, d'autre part, restaurait sur l'aorte et l'artère mésentériques la réponse contractile vasculaire à la phényléphrine et partiellement la relaxation à l'acétylcholine. Ces résultats fournissent une explication à la diminution observée de la quantité de noradrénaline administrée au cours du temps chez les patients en choc septique recevant de l'esmolol par rapport à un placebo dans l'étude d'Andréa Morelli [299]. Par ailleurs, sur le même collectif de patients, Morelli *et al.* ont montré que l'administration d'esmolol était associée à une amélioration de la microcirculation évaluée sur l'index de débit microvasculaire [314]. Cette amélioration cardiovasculaire est à rapporter avec la diminution concomitante de la lactatémie et l'amélioration de la survie.

### **Le blocage $\beta$ 1 adrénergique joue un rôle essentiel dans la modulation de l'inflammation durant le choc septique**

Le système adrénergique joue un rôle clef dans la régulation de l'inflammation en agissant directement sur les cellules de l'immunité. On retrouve ainsi des  $\alpha$  et des  $\beta$  adrénorécepteurs à la surface des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes [253, 268]. La modulation du système  $\beta$  adrénergique impacte de façon majeure le profil inflammatoire. Ainsi, les  $\beta$  bloquants non cardiosélectifs qui sont à la fois des antagonistes des adrénorécepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 ont des effets pro-inflammatoires [315]. Les  $\beta$ 1 bloquants sélectifs ont eux des effets anti-inflammatoires reconnus sur un panel de pathologies cardiovasculaires non-infectieuses [316]. L'administration d'un  $\beta$ 2 mimétique présente de même des effets anti-inflammatoires [264].

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B tient une place centrale dans la promotion de l'inflammation durant le choc septique [317]. Sachant que NF- $\kappa$ B va promouvoir l'augmentation de l'expression de la NO synthase inductible et d'un ensemble de

cytokines pro-inflammatoires, sa place dans l'installation de la défaillance cardio-circulatoire durant le choc septique est prédominante.

Durant le choc septique, l'hyporéactivité vasculaire est intimement reliée à la surexpression de la NO synthase inductible et à la diminution de l'expression du couple p-NO synthase endothéliale/ NO synthase endothéliale et de p-Akt/Akt. Ainsi, les thérapeutiques qui influent sur la diminution de l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ont montré une amélioration sur la dysfonction vasculaire septique [313, 318, 319]. Dans le présent travail, l'adjonction d'un  $\beta$ 1 bloquant cardiosélectif comme l'esmolol permet dans un modèle caricatural de choc septique d'améliorer la fonction cardiaque intrinsèque et la réponse vasculaire aux vasopresseurs comme la phényléphrine. Cette amélioration semble répondre à une diminution de l'expression tissulaire cardiaque et vasculaire de NF- $\kappa$ B associée à une diminution de l'expression protéique de la NO synthase inductible et à une augmentation de l'expression protéique du couple p-NO synthase endothéliale/ NO synthase endothéliale et de p-Akt/Akt. Pour expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque, Suzuki *et al.* ont retrouvé une augmentation de l'expression des  $\beta$ 1 adrénorécepteurs sur le muscle cardiaque par technique immunohistochimique sous esmolol dans un modèle de choc septique expérimental par CLP [287]. L'inflammation systémique est aussi de façon logique atténuée comme cela a été retrouvé par d'autres travaux antérieurs [287, 289, 291]. Finalement, on peut être étonné de l'amélioration de la fonction vasculaire sous  $\beta$ 1 bloquant dans le choc septique. Morelli *et al.* ont montré que sous esmolol par rapport au groupe témoin, les patients recevaient des doses plus faibles de noradrénaline. Il n'existe pourtant qu'une faible proportion de  $\beta$ 1 adrénorécepteurs sur les vaisseaux. Néanmoins, sur un modèle de choc septique par CLP, l'inhibition de l'expression du facteur de transcription de NF- $\kappa$ B était associée à une augmentation de l'expression des  $\alpha$ 1 adrénorécepteurs sur les vaisseaux [320]. On peut ainsi émettre l'hypothèse que ce

mécanisme serait susceptible d'expliquer l'amélioration de la vasoréactivité sous esmolol dans notre travail. En effet, au sein des vaisseaux, sous esmolol, on retrouve une augmentation de l'expression génomique et protéique des  $\alpha_1$  adrénorécepteurs.

On retiendra, au final, que l'adjonction d'esmolol permet une diminution de la fréquence cardiaque associée à une amélioration des fonctions cardiaques et vasculaires. Ces améliorations sont probablement à mettre sur le compte d'un effet anti-inflammatoire tissulaire cardiaque et vasculaire de cette stratégie thérapeutique. Néanmoins, l'impact de la réduction de la fréquence cardiaque dans l'amélioration des fonctions cardiaque et vasculaire et même dans la modulation du profil inflammatoire reste à définir.

### **La réduction isolée de la fréquence cardiaque par ivabradine n'impacte pas sur le profil hémodynamique et inflammatoire**

Chez les patients septiques, les altérations hémodynamiques, l'hypocontractilité cardiaque et l'hypovasaréactivité sont la conséquence entre autres d'une activation inappropriée du système nerveux autonome sympathique [169]. Dans cette situation, où le patient est correctement réanimé, une tachycardie persistante ou l'apparition d'une fibrillation auriculaire paroxystique, représentant une activation sympathique excessive, sont des facteurs indépendants de mauvais pronostics [170, 321, 322]. Dans ce travail, l'ivabradine réduisait efficacement la fréquence cardiaque dans la situation du choc septique, confirmant ainsi un travail précédent [323]. Néanmoins, cette réduction de la fréquence cardiaque n'était associée à aucun effet positif sur la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie et sur la réponse vasculaire à la phényléphrine évaluée *ex vivo* sur banc de myographie. Pour l'instant, il n'existe pas d'autre travail dans la littérature pour comparer nos résultats dans cette situation clinique. En dehors des  $\beta$  bloquants, la littérature est également pauvre sur les effets hémodynamiques cardiovasculaires des autres traitements bradycardisants comme l'amiodarone ou la

digoxine [324]. Chez l'homme il n'existe d'ailleurs qu'un seul travail rétrospectif qui porte chez des patients en post-opératoire de chirurgie cardiaque et qui développent un choc septique. L'adjonction d'ivabradine chez ces patients tachycardes n'était associée à aucun effet hémodynamique négatif [325]. Actuellement, un essai randomisé en ouvert de phase II est en cours et compare les effets de l'adjonction d'ivabradine vs. un placebo chez les patients en défaillance multiviscérale chez qui les  $\beta$ -bloquants sont contre-indiqués (NCT: 01186783). L'objectif principal est uniquement le ralentissement effectif de la fréquence cardiaque et le recueil de la tolérance hémodynamique [326]. Enfin, récemment, Gallet *et al.* ont rapporté, dans une série prospective de patients présentant une insuffisance cardiaque stable, que lors d'une échographie de stress sous dobutamine, l'adjonction d'ivabradine permettait de ralentir efficacement la fréquence cardiaque en gardant les seuls effets inotropes  $\beta_1$  mimétiques [327].

Comme dit précédemment, le rationnel de l'administration d'un  $\beta_1$  bloquant est le ralentissement de la fréquence cardiaque chez le patient présentant une tachycardie persistante malgré une réanimation bien conduite. En comparaison des effets anti-inflammatoires largement décrits des  $\beta_1$  bloquants, l'impact de la réduction isolée de la fréquence cardiaque dans cette situation reste méconnu [287, 289, 293]. Dans la présente étude, la réduction isolée de la fréquence cardiaque par de l'ivabradine sur un modèle expérimental de choc septique sévère n'était à l'origine d'aucune modification du profil inflammatoire systémique et des voies de signalisation explorées sur les tissus cardiaque et vasculaire.

### Limites

Les limitations des travaux présentés sont nombreuses.

Concernant le modèle, la ligature et ponction cœcale est une façon robuste et utilisée depuis fort longtemps pour mimer le choc septique de l'homme [328, 329]. Il s'agit effectivement d'un état de choc dont l'origine est polymicrobienne, digestive,

majoritairement à bacille gram négatif. Néanmoins, il faut reconnaître les limites évidentes de cette méthode. En premier lieu, les rats utilisés sont une population mâle, jeune, sans comorbidité, tandis que la population de patients en choc septique est majoritairement âgée, aux deux tiers seulement masculine mais surtout polypathologique. Malgré les efforts pour tenter de reproduire une prise en charge cohérente et actualisée, la réanimation entreprise dès la 4<sup>e</sup> heure dans notre modèle n'est que sommaire et standardisée. Si cette prise en charge est homogène entre les groupes, il n'en demeure pas moins qu'elle est éloignée de la prise en charge individualisée dont bénéficient les patients de réanimation. Le modèle animal utilisé dans les deux travaux présentés, mais qui sera le même dans les travaux 4 et 5, présente une limite conceptuelle majeure. En effet, le débit cardiaque chez le petit animal (rat, souris) est essentiellement chronotrope dépendant. On peut supposer que les effets observés d'un traitement  $\beta$ 1 bloquant chez ces petits animaux en choc septique sont fort différents de ceux observés dans les modèles plus grands moins tachycardes. D'ailleurs, les effets hémodynamiques et inflammatoires observés d'un traitement par  $\beta$ 1 bloquant dans des modèles de sepsis porcins et ovins sont fort différents des études chez le rat [290, 292]. Dans le travail sur modèle de sepsis endotoxinique porcine, Aboab *et al.* n'avaient ainsi retrouvé aucune amélioration de la fonction cardiovasculaire sous perfusion esmolol [290]. Cavalacca *et al.* avaient étudié sur un modèle de sepsis bactériémique ovin, les effets de l'administration d'aténolol. Les auteurs n'ont retrouvé aucune diminution de synthèse des cytokines pro-inflammatoires ni aucun effet protecteur du traitement administré vis-à-vis de l'apparition de l'insuffisance rénale [292]. Dans ces deux modèles de sepsis chez le gros animal, la tolérance de la réduction de la fréquence cardiaque avait été excellente sans altération de la pression artérielle moyenne.

D'aucuns diront que la réduction de la fréquence cardiaque par esmolol est un traitement remarquablement toléré aussi chez l'homme, comme dans l'étude de Morelli *et al.* [299]. Cependant, il s'agit de pondérer cette affirmation en remarquant que cette étude n'a pour l'instant jamais été reproduite et que les études en cours tardent à venir du fait d'un recrutement difficile comme pour l'étude Esmosepsis (travail 3).

En effet, l'objectif de réduction de la fréquence cardiaque trouve sa justification dans le cadre d'une tachycardie persistante, symptomatique d'un niveau inadapté d'activation du système nerveux sympathique. Néanmoins, si cet objectif est théoriquement légitime, il est très compliqué autant en pratique expérimentale qu'en clinique de différencier une tachycardie adaptative d'une tachycardie persistante inadaptée. Pour preuve dans le travail expérimental numéro 2 portant sur l'ivabradine, malgré nos efforts de réanimation volémique ( $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), la diminution du volume d'éjection et du débit cardiaque dans le groupe CLP témoigne d'un certain degré de tachycardie adaptative. Lorsque l'on regarde les travaux randomisés les plus récents sur le choc septique, on se rend compte que les patients avec une tachycardie persistante représentent une population restreinte. Par exemple, dans l'étude PROCESS, travail multicentrique, randomisé, qui comparait trois stratégies de prise en charge du choc septique à la phase initiale, la fréquence cardiaque à l'inclusion se révélait être de 114 bpm en moyenne. A six heures de la prise en charge, elle n'était plus qu'à 97 bpm en et à 95 bpm à 24 heures [36]. Conceptuellement, on peut donc s'interroger sur la pertinence de cet objectif de réduction de la fréquence cardiaque dans le choc septique pour une tachycardie qui n'existe plus dès la 24<sup>e</sup> heures de prise en charge. Finalement, la tachycardie persistante inadaptée, dont l'existence n'est pas pour autant à remettre en cause, a probablement une incidence faible. Il serait sûrement légitime de déterminer dans un premier temps l'épidémiologie de la population en choc septique qui présenterait une tachycardie inadaptée prolongée afin de mieux définir à qui le traitement  $\beta$ 1 bloqueur va être le plus

adapté. La méthodologie à utiliser ne serait pas évidente car l'évaluation du niveau d'activité du système nerveux autonome n'est pas standardisée, même si certaines pistes se dessinent au bloc opératoire [330]. Leurs validités dans le contexte de la réanimation où se surajoutent de nombreux facteurs confondants (catécholamines, sédation, comorbidités sous-jacentes) restent à confirmer. Sans disposer d'épidémiologie précise, on peut déjà se poser la question de la pertinence de ce traitement dans cette indication.

Néanmoins, le traitement par  $\beta_1$  bloquant présente, outre ses effets hémodynamiques propres, des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, si les  $\beta_1$  bloquants ne trouvent qu'une place modeste pour leurs effets hémodynamiques directs dans le choc septique, les effets indirects anti-inflammatoires sont probablement les plus intéressants. C'est dans cette optique qu'est actuellement mené le travail 4. Ce dernier évalue les effets hémodynamiques et inflammatoires d'une posologie réduite d'esmolol, sans réduction de la fréquence cardiaque sur le même modèle expérimental de choc septique.



## Conclusion

Une antagonisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques durant le choc septique expérimental par esmolol permet une amélioration de la fonction cardiaque intrinsèque et de la réponse vasculaire à la phényléphrine. Ces effets semblent liés aux effets anti-inflammatoires de l'esmolol. La réduction de la fréquence cardiaque ne semble pas être un élément déterminant de l'amélioration de l'hémodynamique et de l'inflammation. En effet, une réduction isolée de la fréquence cardiaque par ivabradine sur le même modèle expérimental de choc septique n'apporte aucun bénéfice sur les paramètres échocardiographiques, la vasoréactivité *ex-vivo* et les voies de l'inflammation explorées.

## Perspectives

Il semblerait donc que les effets bénéfiques hémodynamiques, durant le choc septique expérimental, de l'administration d'un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques soient liés essentiellement aux effets anti-inflammatoires. Le rationnel de l'administration de ce traitement repose entre autres sur l'existence d'une activation inappropriée du système nerveux autonome dont l'expression clinique est une tachycardie persistante. L'objectif thérapeutique principal est donc en première instance de ralentir la fréquence cardiaque. Les résultats présentés dans le travail 2 donnent des arguments contre cette approche. Il s'agit donc, dès lors, de tester les effets hémodynamiques et inflammatoires d'un traitement par un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques tel que l'esmolol à des doses qui n'induisent pas de réduction de la fréquence cardiaque. Il existe des arguments qui suggèrent les effets anti inflammatoires dont nous supposons qu'ils sont à l'origine de la majorité des effets hémodynamiques bénéfiques observés. Ainsi Ibrahim-zada I *et al.* ont montré dans un modèle endotoxinique murin que l'administration, même à dose minime, d'un antagoniste des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques tel que l'esmolol améliorerait la survie sans pour autant

présenter d'amélioration de la fonction cardiaque. Ils retrouvaient aussi une modulation de l'expression des gènes des voies de l'inflammation et en particulier CAMP (Cathelicidin antimicrobial peptide lié à NF- $\kappa$ B) et TNFSF10 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10) [293].

#### **Travail 4 :**

L'hypothèse principale est qu'une posologie réduite d'esmolol sans effet chronotrope négatif permet une amélioration de la fonction cardiaque et de la vasoréactivité *via* les effets spécifiques sur la signalisation inflammatoire des  $\beta$ 1 bloquants.

Nous avons pour objectif de tester sur le même modèle de choc septique expérimental que décrit dans les travaux 1 et 2, trois doses d'esmolol dégressives : 18 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 5 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et 1 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

#### **Méthodologie**

La méthodologie employée reprend celle du travail 1.

Nous évaluerons dans ce travail :

- la fonction cardiaque par échocardiographie,
- la vasoréactivité sur banc de myographie,
- l'inflammation systémique par le dosage des cytokines suivantes : IL6, IL10 et TNF $\alpha$
- la signalisation inflammatoire suivante sur le tissu cardiaque et vasculaire par Western blot : NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , eNOS et Akt, iNOS,
- l'expression par PCR dans le cœur et les vaisseaux des  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 adréno-récepteurs,
- l'expression protéique par western Blot dans le cœur et les vaisseaux des  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 adréno-récepteurs.

### *Etat d'avancement de ce travail*

L'ensemble des expérimentations hémodynamiques *in vivo* et *ex vivo* sont réalisées. Les westerns blots des protéines de l'inflammation sont terminés. L'évaluation de l'inflammation systémique et de l'expression génomique et protéique des adrénorécepteurs est prévue pour janvier et février 2016.

### **Travail 5 :**

Dans les suites des travaux 1, 2, 3 et 4 réalisés, il ressort que durant le choc septique, les effets hémodynamiques favorables observés sont essentiellement liés à une modulation des voies de l'inflammation. Les cellules de l'immunité qui vont promouvoir l'inflammation sont régulées en partie par le système  $\beta$  adrénergique [271]. Les monocytes présentent ainsi à leur surface des adrénorécepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  et la stimulation des adrénorécepteurs  $\beta 1$  semble associée à une réponse pro-inflammatoire [268]. Durant le choc septique, les cellules monocytaires infiltrent le tissu myocardique et par conséquent sont en partie responsables de la propagation de l'inflammation.

L'hypothèse principale du travail 5 est que l'administration d'un antagoniste des récepteurs  $\beta 1$ -adrénergiques, va réguler la balance  $\beta 1 / \beta 2$  adrénergique en faveur de l'activation des  $\beta 2$  adrénorécepteurs et ainsi promouvoir une réponse anti-inflammatoire Th2 pouvant expliquer en partie l'amélioration de la fonction cardiovasculaire dans le choc septique expérimental.

### *Méthodologie*

Nous utiliserons un modèle de choc septique par CLP chez la souris. L'administration d'esmolol se fera *via* une pompe osmotique qui sera implantée lors de la chirurgie.

Nous aurons dans ce travail 9 groupes :

Groupe 1 : SHAM souris sauvage

Groupe 2 : SHAM souris KO  $\beta 1$  -/-

Groupe 3 : SHAM souris surexprimé  $\beta 1$

Groupe 4 : CLP

Groupe 5 : CLP chez souris KO  $\beta 1$  -/-

Groupe 6 : CLP chez souris surexprimé  $\beta 1$

Groupe 7 : CLP + esmolol

Groupe 8 : CLP chez souris KO  $\beta 1$  -/- + esmolol

Groupe 9 : CLP chez souris surexprimé  $\beta 1$  + esmolol

Nous étudierons à 18 heures :

- fonction cardiaque par échocardiographie,
- vasoréactivité *ex vivo* sur banc de myographie,
- médiateurs pro- et anti-inflammatoires systémiques par ELISA,
- l'expression protéique sur le cœur et les vaisseaux de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , eNOS, Akt, iNOS, adrénorecepteurs  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$ ,
- densité d'expression des adrénorécepteurs  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  à la surface des monocytes par cytométrie en flux,
- densité d'expression des cytokines inflammatoires (IL-4, INF- $\gamma$ ) au sein des lymphocytes T permettant un typage Th1-Th2 associé à la mesure conjointe de la densité d'expression des adrénorécepteurs  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  à la surface. L'ensemble sera réalisé par cytométrie en flux,
- récupération des cellules monocytaires au trieur du cytomètre pour analyse génomique et protéique de l'expression NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , eNOS, Akt, iNOS, adrénorecepteurs  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$ .

### ***Etat d'avancement de ce travail***

Début des essais sur des souris sauvages mars 2016. Fin du travail prévu décembre 2017.

## Références

1. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R: **Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012.** *JAMA* 2014, **311**(13):1308-1316.
2. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B: **EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units.** *Intensive care medicine* 2004, **30**(4):580-588.
3. Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, Castelain V, Barraud D, Cousson J, Louis G *et al*: **The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study.** *Critical care (London, England)* 2013, **17**(2):R65.
4. Girard TD, Opal SM, Ely EW: **Insights into severe sepsis in older patients: from epidemiology to evidence-based management.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005, **40**(5):719-727.
5. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R *et al*: **Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012.** *Critical care medicine* 2013, **41**(2):580-637.
6. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW *et al*: **Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.** *The New England journal of medicine* 2001, **344**(10):699-709.
7. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A *et al*: **Drotrecogin alfa (activated) in adults**

- with septic shock.** *The New England journal of medicine* 2012, **366**(22):2055-2064.
8. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M *et al*: **Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013, **309**(11):1154-1162.
  9. Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K: **Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy.** *Journal of the American College of Cardiology* 2001, **37**(2):412-417.
  10. **American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.** *Critical care medicine* 1992, **20**(6):864-874.
  11. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R: **Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis.** *The New England journal of medicine* 2015, **372**(17):1629-1638.
  12. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG: **Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006, **177**(3):1967-1974.
  13. Drewry AM, Hotchkiss RS: **Sepsis: Revising definitions of sepsis.** *Nature reviews Nephrology* 2015, **11**(6):326-328.

14. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Critical care medicine* 2003, **31**(4):1250-1256.
15. Minino AM, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B: **Death in the United States, 2007.** *NCHS data brief* 2009(26):1-8.
16. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y *et al*: **International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.** *JAMA* 2009, **302**(21):2323-2329.
17. Galbois A, Aegerter P, Martel-Samb P, Housset C, Thabut D, Offenstadt G, Ait-Oufella H, Maury E, Guidet B: **Improved prognosis of septic shock in patients with cirrhosis: a multicenter study\*.** *Critical care medicine* 2014, **42**(7):1666-1675.
18. Zuber B, Tran TC, Aegerter P, Grimaldi D, Charpentier J, Guidet B, Mira JP, Pene F: **Impact of case volume on survival of septic shock in patients with malignancies.** *Critical care medicine* 2012, **40**(1):55-62.
19. Quenot JP, Pavon A, Fournel I, Barbar DD, Bruyere R: **Septic Shock in Adult in France: 20 years of Epidemiological Data.** *Réanimation* 2015, **24**:303-309.
20. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B: **Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis.** *JAMA* 1995, **274**(12):968-974.
21. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J: **Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996, **154**(3 Pt 1):617-624.

22. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R *et al*: **Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study.** *Intensive care medicine* 2002, **28**(2):108-121.
23. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B, Network CU-R: **Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, **168**(2):165-172.
24. Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, Dreyfuss D: **Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis.** *Chest* 2005, **127**(3):942-951.
25. Adrie C, Azoulay E, Francais A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, Nakache D, Jamali S, Goldgran-Toledano D, Garrouste-Orgeas M *et al*: **Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal.** *Chest* 2007, **132**(6):1786-1793.
26. Zahar JR, Timsit JF, Garrouste-Orgeas M, Francais A, Vesin A, Descorps-Declere A, Dubois Y, Souweine B, Haouache H, Goldgran-Toledano D *et al*: **Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality.** *Critical care medicine* 2011, **39**(8):1886-1895.
27. Larche J, Azoulay E, Fieux F, Mesnard L, Moreau D, Thiery G, Darmon M, Le Gall JR, Schlemmer B: **Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock.** *Intensive care medicine* 2003, **29**(10):1688-1695.
28. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: **Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock.** *The New England journal of medicine* 2001, **345**(19):1368-1377.
29. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: **Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a**



- trend analysis from 1993 to 2003.** *Critical care medicine* 2007, **35**(5):1244-1250.
30. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H *et al*: **Hydrocortisone therapy for patients with septic shock.** *The New England journal of medicine* 2008, **358**(2):111-124.
31. Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P, Henderson WR *et al*: **Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients.** *The New England journal of medicine* 2009, **360**(13):1283-1297.
32. Schramm GE, Kashyap R, Mullon JJ, Gajic O, Afessa B: **Septic shock: a multidisciplinary response team and weekly feedback to clinicians improve the process of care and mortality.** *Critical care medicine* 2011, **39**(2):252-258.
33. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R *et al*: **The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis.** *Intensive care medicine* 2010, **36**(2):222-231.
34. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ: **Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis\*.** *Critical care medicine* 2014, **42**(3):625-631.
35. Peake SL, Delaney A, Bailey M, Bellomo R, Cameron PA, Cooper DJ, Higgins AM, Holdgate A, Howe BD, Webb SA *et al*: **Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock.** *The New England journal of medicine* 2014, **371**(16):1496-1506.
36. Yealy DM, Kellum JA, Huang DT, Barnato AE, Weissfeld LA, Pike F, Terndrup T, Wang HE, Hou PC, LoVecchio F *et al*: **A randomized trial of protocol-based care**

- for early septic shock.** *The New England journal of medicine* 2014, **370**(18):1683-1693.
37. Brennan CA, Anderson KV: **Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response.** *Annual review of immunology* 2004, **22**:457-483.
38. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: **Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.** *Immunity* 1999, **11**(4):443-451.
39. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA *et al*: **The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(7):1135-1143.
40. Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Arnaout MA, Golenbock DT, Freeman MW: **Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000, **165**(8):4272-4280.
41. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M: **MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(11):1777-1782.
42. Caruso R, Warner N, Inohara N, Nunez G: **NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease.** *Immunity* 2014, **41**(6):898-908.
43. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA: **The inflammasome: first line of the immune response to cell stress.** *Cell* 2006, **126**(4):659-662.
44. Lukaszewicz AC, Faivre V, Payen D: **Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection?** *Minerva anesthesiologica* 2010, **76**(9):737-743.

45. Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D: **Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction.** *Critical care medicine* 2009, **37**(10):2746-2752.
46. Hoebe K, Janssen E, Beutler B: **The interface between innate and adaptive immunity.** *Nature immunology* 2004, **5**(10):971-974.
47. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E: **Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality.** *Chest* 1993, **103**(2):565-575.
48. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA: **TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.** *Nature genetics* 2000, **25**(2):187-191.
49. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, He Q, Svetkauskaite D, Murphy JR, Abraham E: **Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, **173**(12):1335-1341.
50. Liu G, Tsuruta Y, Gao Z, Park YJ, Abraham E: **Variant IL-1 receptor-associated kinase-1 mediates increased NF-kappa B activity.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007, **179**(6):4125-4134.
51. Meyer NJ, Ferguson JF, Feng R, Wang F, Patel PN, Li M, Xue C, Qu L, Liu Y, Boyd JH *et al*: **A functional synonymous coding variant in the IL1RN gene is associated with survival in septic shock.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014, **190**(6):656-664.
52. Toubiana J, Courtine E, Pene F, Viallon V, Asfar P, Daubin C, Rousseau C, Chenot C, Ouaz F, Grimaldi D *et al*: **IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock.** *Critical care medicine* 2010, **38**(12):2287-2294.

53. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R: **Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view.** *Mediators of inflammation* 2013, **2013**:165974.
54. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA: **Harmful molecular mechanisms in sepsis.** *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(10):776-787.
55. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R *et al*: **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* 1995, **273**(12):934-941.
56. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL: **Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis.** *Shock* 2005, **23**(6):488-493.
57. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD: **Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock.** *Infection and immunity* 2002, **70**(8):4441-4446.
58. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK: **IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2003, **285**(2):E433-437.
59. Bone RC: **Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.** *Critical care medicine* 1996, **24**(7):1125-1128.
60. Ravat F, Payre J, Peslages P, Fontaine M, Sens N: **[Burn: An inflammatory process].** *Pathologie-biologie* 2011, **59**(3):e63-72.
61. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: **Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(12):862-874.

62. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiological reviews* 2007, **87**(1):315-424.
63. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H: **Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control.** *Biochemical pharmacology* 1995, **50**(9):1321-1332.
64. Wu CC, Szabo C, Chen SJ, Thiemermann C, Vane JR: **Activation of soluble guanylyl cyclase by a factor other than nitric oxide or carbon monoxide contributes to the vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents in the aorta of rats treated with endotoxin.** *Biochemical and biophysical research communications* 1994, **201**(1):436-442.
65. Park JW, Pikhova B, Nghiem K, Lozier JN, Schechter AN: **Inhibitory effect of nitrite on coagulation processes demonstrated by thrombelastography.** *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2014, **40**:45-51.
66. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: **Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(11):4651-4655.
67. Levonen AL, Patel RP, Brookes P, Go YM, Jo H, Parthasarathy S, Anderson PG, Darley-Usmar VM: **Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: from mitochondria to MAP kinases.** *Antioxidants & redox signaling* 2001, **3**(2):215-229.
68. Meyer J, Traber LD, Nelson S, Lentz CW, Nakazawa H, Herndon DN, Noda H, Traber DL: **Reversal of hyperdynamic response to continuous endotoxin administration by inhibition of NO synthesis.** *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 1992, **73**(1):324-328.

69. Meyer J, Lentz CW, Stothert JC, Jr., Traber LD, Herndon DN, Traber DL: **Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia.** *Critical care medicine* 1994, **22**(2):306-312.
70. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D *et al*: **Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 2004, **32**(1):21-30.
71. Booke M, Hinder F, McGuire R, Traber LD, Traber DL: **Nitric oxide synthase inhibition versus norepinephrine for the treatment of hyperdynamic sepsis in sheep.** *Critical care medicine* 1996, **24**(5):835-844.
72. Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW, Bruining HA: **Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study.** *Critical care medicine* 1998, **26**(4):660-667.
73. Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, Buijk SL, Kanhai KJ, Bruining HA: **Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on cardiopulmonary function in human septic shock.** *Chest* 1998, **113**(6):1640-1646.
74. Avontuur JA, Stam TC, Jongen-Lavrencic M, van Amsterdam JG, Eggermont AM, Bruining HA: **Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock.** *Intensive care medicine* 1998, **24**(7):673-679.
75. Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E: **Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004, **172**(4):2522-2529.
76. Kornfeld OS, Hwang S, Disatnik MH, Chen CH, Qvit N, Mochly-Rosen D: **Mitochondrial reactive oxygen species at the heart of the matter: new**

- therapeutic approaches for cardiovascular diseases.** *Circulation research* 2015, **116**(11):1783-1799.
77. Liaudet L, Vassalli G, Pacher P: **Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways.** *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2009, **14**:4809-4814.
78. Dennis EA, Norris PC: **Eicosanoid storm in infection and inflammation.** *Nature reviews Immunology* 2015, **15**(8):511-523.
79. Treffkorn L, Scheibe R, Maruyama T, Dieter P: **PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1alpha, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages.** *Prostaglandins & other lipid mediators* 2004, **74**(1-4):113-123.
80. Shinomiya S, Naraba H, Ueno A, Utsunomiya I, Maruyama T, Ohuchida S, Ushikubi F, Yuki K, Narumiya S, Sugimoto Y *et al*: **Regulation of TNFalpha and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists.** *Biochemical pharmacology* 2001, **61**(9):1153-1160.
81. Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, Saper CB: **EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses.** *Nature neuroscience* 2007, **10**(9):1131-1133.
82. Bray MA, Cunningham FM, Ford-Hutchinson AW, Smith MJ: **Leukotriene B4: a mediator of vascular permeability.** *Br J Pharmacol* 1981, **72**(3):483-486.
83. Weiss HJ, Turitto VT: **Prostacyclin (prostaglandin I2, PGI2) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium.** *Blood* 1979, **53**(2):244-250.

84. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR: **Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium.** *Thrombosis research* 1977, **11**(3):323-344.
85. Kabashima K, Murata T, Tanaka H, Matsuoka T, Sakata D, Yoshida N, Katagiri K, Kinashi T, Tanaka T, Miyasaka M *et al*: **Thromboxane A<sub>2</sub> modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity.** *Nature immunology* 2003, **4**(7):694-701.
86. Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F: **Thromboxane A<sub>2</sub>-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase Czeta.** *Circulation research* 2003, **93**(7):656-663.
87. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM: **Thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions.** *Hypertension* 1990, **15**(6 Pt 2):699-703.
88. Haupt MT, Jastremski MS, Clemmer TP, Metz CA, Goris GB: **Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group.** *Critical care medicine* 1991, **19**(11):1339-1347.
89. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG: **Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology.** *British journal of haematology* 2009, **145**(1):24-33.
90. Iba T, Ito T, Maruyama I, Jilma B, Brenner T, Muller MC, Juffermans NP, Thachil J: **Potential diagnostic markers for disseminated intravascular coagulation of sepsis.** *Blood reviews* 2015.



91. Taylor FB, Jr., Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS: **Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody.** *Circulatory shock* 1991, **33**(3):127-134.
92. Castellino FJ, Ploplis VA: **The protein C pathway and pathologic processes.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2009, **7 Suppl 1**:140-145.
93. Biemond BJ, Levi M, Ten Cate H, Van der Poll T, Buller HR, Hack CE, Ten Cate JW: **Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades.** *Clinical science (London, England : 1979)* 1995, **88**(5):587-594.
94. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR *et al*: **Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees.** *The Journal of experimental medicine* 1994, **179**(4):1253-1259.
95. Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer SJ, van Deursen P, van Kerkhoff L, van Gemen B, ten Cate H *et al*: **The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation.** *Blood* 2000, **96**(2):554-559.
96. Matsumoto H, Yamakawa K, Ogura H, Koh T, Matsumoto N, Shimazu T: **Enhanced expression of cell-specific surface antigens on endothelial microparticles in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation.** *Shock* 2015, **43**(5):443-449.
97. Weiler H: **Multiple receptor-mediated functions of activated protein C.** *Hamostaseologie* 2011, **31**(3):185-195.
98. Starr ME, Takahashi H, Okamura D, Zwischenberger BA, Mrazek AA, Ueda J, Stromberg AJ, Evers BM, Esmon CT, Saito H: **Increased coagulation and**

- suppressed generation of activated protein C in aged mice during intra-abdominal sepsis.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2015, **308**(2):H83-91.
99. Starr ME, Ueda J, Takahashi H, Weiler H, Esmon CT, Evers BM, Saito H: **Age-dependent vulnerability to endotoxemia is associated with reduction of anticoagulant factors activated protein C and thrombomodulin.** *Blood* 2010, **115**(23):4886-4893.
100. Levi M, van der Poll T: **Inflammation and coagulation.** *Critical care medicine* 2010, **38**(2 Suppl):S26-34.
101. Hartemink KJ, Hack CE, Groeneveld AB: **Relation between coagulation/fibrinolysis and lactate in the course of human septic shock.** *Journal of clinical pathology* 2010, **63**(11):1021-1026.
102. Weitz JI, Stewart RJ, Fredenburgh JC: **Mechanism of action of plasminogen activators.** *Thrombosis and haemostasis* 1999, **82**(2):974-982.
103. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF: **Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(5):2534-2538.
104. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB: **The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent.** *Blood* 1996, **88**(6):2093-2100.
105. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN: **Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin.** *Thrombosis and haemostasis* 2001, **85**(1):5-11.
106. Hesselvik JF, Blomback M, Brodin B, Maller R: **Coagulation, fibrinolysis, and kallikrein systems in sepsis: relation to outcome.** *Critical care medicine* 1989, **17**(8):724-733.

107. Philippe J, Offner F, Declerck PJ, Leroux-Roels G, Vogelaers D, Baele G, Collen D: **Fibrinolysis and coagulation in patients with infectious disease and sepsis.** *Thrombosis and haemostasis* 1991, **65**(3):291-295.
108. Lorente JA, Garcia-Frade LJ, Landin L, de Pablo R, Torrado C, Renes E, Garcia-Avello A: **Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome.** *Chest* 1993, **103**(5):1536-1542.
109. Bode M, Mackman N: **Regulation of tissue factor gene expression in monocytes and endothelial cells: Thromboxane A2 as a new player.** *Vascular pharmacology* 2014, **62**(2):57-62.
110. Marshall JC: **Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(5):391-405.
111. Kimmoun A, Rodaix C, Annane D: **Corticoïdes et choc septique:** J.E.P.U; 2011.
112. Kreymann G, Grosser S, Buggisch P, Gottschall C, Matthaei S, Greten H: **Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock.** *Critical care medicine* 1993, **21**(7):1012-1019.
113. Boekstegers P, Weidenhofer S, Kapsner T, Werdan K: **Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis.** *Critical care medicine* 1994, **22**(4):640-650.
114. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE: **Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction.** *Critical care medicine* 1999, **27**(7):1230-1251.
115. Abosaif NY, Tolba YA, Heap M, Russell J, El Nahas AM: **The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2005, **46**(6):1038-1048.

116. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH: **Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases.** *FEBS letters* 1994, **345**(1):50-54.
117. Brown GC: **Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase.** *FEBS letters* 1995, **369**(2-3):136-139.
118. Borutaite V, Moncada S, Brown GC: **Nitric oxide from inducible nitric oxide synthase sensitizes the inflamed aorta to hypoxic damage via respiratory inhibition.** *Shock* 2005, **23**(4):319-323.
119. Dahm CC, Moore K, Murphy MP: **Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(15):10056-10065.
120. Cassina A, Radi R: **Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport.** *Archives of biochemistry and biophysics* 1996, **328**(2):309-316.
121. Sharpe MA, Cooper CE: **Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(47):30961-30972.
122. Brown GC: **Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase.** *Biochimica et biophysica acta* 2001, **1504**(1):46-57.

123. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007, **39**(1):44-84.
124. Carre JE, Orban JC, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman HB, Piantadosi CA, Mayhew TM, Breen P *et al*: **Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010, **182**(6):745-751.
125. Kimmoun A, Novy E, Auchet T, Ducrocq N, Levy B: **Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside.** *Critical care (London, England)* 2015, **19**:175.
126. Jockusch BM, Isenberg G: **Interaction of alpha-actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, **78**(5):3005-3009.
127. Kee AJ, Gunning PW, Hardeman EC: **Diverse roles of the actin cytoskeleton in striated muscle.** *J Muscle Res Cell Motil* 2009, **30**(5-6):187-197.
128. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ: **Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology.** *Cardiovasc Res* 2008, **77**(2):265-273.
129. Knollmann BC: **New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle.** *J Physiol* 2009, **587**(Pt 13):3081-3087.
130. Gyorke S, Terentyev D: **Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease.** *Cardiovasc Res* 2008, **77**(2):245-255.
131. Rozemberg S, Tavernier B: **contraction cardiaque.** In: *Physiologie Humaine Appliquée*. Edited by Arnette; 2009: 19-32.

132. Endo M: **Calcium-induced calcium release in skeletal muscle.** *Physiological reviews* 2009, **89**(4):1153-1176.
133. Gordon AM, Homsher E, Regnier M: **Regulation of contraction in striated muscle.** *Physiological reviews* 2000, **80**(2):853-924.
134. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE: **Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock.** *Ann Intern Med* 1984, **100**(4):483-490.
135. Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F: **Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock.** *Critical care medicine* 2008, **36**(6):1701-1706.
136. Vieillard Baron A, Schmitt JM, Beauchet A, Augarde R, Prin S, Page B, Jardin F: **Early preload adaptation in septic shock? A transesophageal echocardiographic study.** *Anesthesiology* 2001, **94**(3):400-406.
137. Werdan K, Oelke A, Hettwer S, Nuding S, Bubel S, Hoke R, Russ M, Lautenschlager C, Mueller-Werdan U, Ebel H: **Septic cardiomyopathy: hemodynamic quantification, occurrence, and prognostic implications.** *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2011, **100**(8):661-668.
138. Repesse X, Charron C, Vieillard-Baron A: **Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock.** *Critical care (London, England)* 2013, **17**(4):164.
139. Kimmoun A, Ducrocq N, Mory S, Delfosse R, Muller L, Perez P, Fay R, Levy B: **Cardiac contractile reserve parameters are related to prognosis in septic shock.** *BioMed research international* 2013, **2013**:930673.
140. Vallet B, Chopin C, Curtis SE, Dupuis BA, Fourrier F, Mehdaoui H, LeRoy B, Rime A, Santre C, Herbecq P *et al*: **Prognostic value of the dobutamine test in patients**

- with sepsis syndrome and normal lactate values: a prospective, multicenter study.** *Critical care medicine* 1993, **21**(12):1868-1875.
141. Rhodes A, Lamb FJ, Malagon I, Newman PJ, Grounds RM, Bennett ED: **A prospective study of the use of a dobutamine stress test to identify outcome in patients with sepsis, severe sepsis, or septic shock.** *Critical care medicine* 1999, **27**(11):2361-2366.
142. Kumar A, Schupp E, Bunnell E, Ali A, Milcarek B, Parrillo JE: **Cardiovascular response to dobutamine stress predicts outcome in severe sepsis and septic shock.** *Critical care (London, England)* 2008, **12**(2):R35.
143. Robotham JL, Takata M, Berman M, Harasawa Y: **Ejection fraction revisited.** *Anesthesiology* 1991, **74**(1):172-183.
144. Bouhemad B, Nicolas-Robin A, Arbelot C, Arthaud M, Feger F, Rouby JJ: **Acute left ventricular dilatation and shock-induced myocardial dysfunction.** *Critical care medicine* 2009, **37**(2):441-447.
145. Mantero A, Gentile F, Gualtierotti C, Azzollini M, Barbier P, Beretta L, Casazza F, Corno R, Giagnoni E, Lippolis A *et al*: **Left ventricular diastolic parameters in 288 normal subjects from 20 to 80 years old.** *European heart journal* 1995, **16**(1):94-105.
146. Jardin F, Fourme T, Page B, Loubieres Y, Vieillard-Baron A, Beauchet A, Bourdarias JP: **Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock.** *Chest* 1999, **116**(5):1354-1359.
147. Huang SJ, Nalos M, McLean AS: **Is early ventricular dysfunction or dilatation associated with lower mortality rate in adult severe sepsis and septic shock? A meta-analysis.** *Critical care (London, England)* 2013, **17**(3):R96.

148. Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, Avidan A, Beeri R, Weissman C, Jaffe AS *et al*: **Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock**. *European heart journal* 2012, **33**(7):895-903.
149. Landesberg G, Jaffe AS, Gilon D, Levin PD, Goodman S, Abu-Baih A, Beeri R, Weissman C, Sprung CL, Landesberg A: **Troponin elevation in severe sepsis and septic shock: the role of left ventricular diastolic dysfunction and right ventricular dilatation\***. *Critical care medicine* 2014, **42**(4):790-800.
150. Smeding L, Plotz FB, Groeneveld AB, Kneyber MC: **Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock**. *Shock* 2012, **37**(5):449-456.
151. Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS, Riedinger MS, Swan HJ, Murata GH: **Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study**. *Journal of the American College of Cardiology* 1984, **4**(5):945-951.
152. Vincent JL, Reuse C, Frank N, Contempre B, Kahn RJ: **Right ventricular dysfunction in septic shock: assessment by measurements of right ventricular ejection fraction using the thermodilution technique**. *Acta Anaesthesiol Scand* 1989, **33**(1):34-38.
153. ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK: **Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock**. *Clinical chemistry* 2000, **46**(5):650-657.
154. Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR: **Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock**. *International journal of cardiology* 2004, **95**(1):13-17.
155. Ammann P, Fehr T, Minder EI, Gunter C, Bertel O: **Elevation of troponin I in sepsis and septic shock**. *Intensive care medicine* 2001, **27**(6):965-969.



156. Favory R, Neviere R: **Significance and interpretation of elevated troponin in septic patients.** *Critical care (London, England)* 2006, **10**(4):224.
157. Varpula M, Pulkki K, Karlsson S, Ruokonen E, Pettila V: **Predictive value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe sepsis and septic shock.** *Critical care medicine* 2007, **35**(5):1277-1283.
158. McLean AS, Huang SJ, Hyams S, Poh G, Nalos M, Pandit R, Balik M, Tang B, Seppelt I: **Prognostic values of B-type natriuretic peptide in severe sepsis and septic shock.** *Critical care medicine* 2007, **35**(4):1019-1026.
159. Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut JF, Mira JP, Chiche JD: **Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis.** *Critical care medicine* 2004, **32**(3):660-665.
160. Maeder M, Fehr T, Rickli H, Ammann P: **Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides.** *Chest* 2006, **129**(5):1349-1366.
161. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE: **The coronary circulation in human septic shock.** *Circulation* 1986, **73**(4):637-644.
162. Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, Lefevre G, Dall'Ava-Santucci J, Brunet F, Villemant D, Carli A, Raichvarg D: **Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock.** *Circulation* 1987, **75**(3):533-541.
163. Hotchkiss RS, Rust RS, Dence CS, Wasserman TH, Song SK, Hwang DR, Karl IE, Welch MJ: **Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [18F]fluoromisonidazole.** *Am J Physiol* 1991, **261**(4 Pt 2):R965-972.
164. Hotchkiss RS, Karl IE: **Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis.** *JAMA* 1992, **267**(11):1503-1510.

165. Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG: **Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock.** *Cardiovasc Res* 1991, **25**(1):80-88.
166. Solomon MA, Correa R, Alexander HR, Koev LA, Cobb JP, Kim DK, Roberts WC, Quezado ZM, Scholz TD, Cunnion RE *et al*: **Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis.** *Am J Physiol* 1994, **266**(2 Pt 2):H757-768.
167. Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N: **Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis.** *The American journal of pathology* 2006, **169**(5):1567-1576.
168. Madorin WS, Rui T, Sugimoto N, Handa O, Cepinskas G, Kvietys PR: **Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC.** *Circulation research* 2004, **94**(7):944-951.
169. Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P: **Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999, **160**(2):458-465.
170. Leibovici L, Gafter-Gvili A, Paul M, Almanasreh N, Tacconelli E, Andreassen S, Nielsen AD, Frank U, Cauda R: **Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality.** *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2007, **100**(10):629-634.
171. Lew WY, Yasuda S, Yuan T, Hammond HK: **Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits.** *J Mol Cell Cardiol* 1996, **28**(6):1367-1371.

172. Liu S, Schreur KD: **G protein-mediated suppression of L-type Ca<sup>2+</sup> current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes.** *Am J Physiol* 1995, **268**(2 Pt 1):C339-349.
173. Buckley JF, Singer M, Clapp LH: **Role of KATP channels in sepsis.** *Cardiovasc Res* 2006, **72**(2):220-230.
174. Dong LW, Wu LL, Ji Y, Liu MS: **Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis.** *Shock* 2001, **16**(1):33-39.
175. Wu LL, Ji Y, Dong LW, Liu MS: **Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum is impaired during the hypodynamic phase of sepsis in the rat heart.** *Shock* 2001, **15**(1):49-55.
176. Wu LL, Tang C, Dong LW, Liu MS: **Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis.** *Shock* 2002, **17**(5):389-393.
177. Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, Bouazza Y, Decoster B, Lancel S, Neviere R: **Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction.** *Critical care medicine* 2008, **36**(9):2590-2596.
178. Tavernier B, Garrigue D, Boulle C, Vallet B, Adnet P: **Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits.** *Cardiovasc Res* 1998, **38**(2):472-479.
179. Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V: **Phosphorylation-dependent alteration in myofilament ca<sup>2+</sup> sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(2):362-367.

180. Marshall M, Anilkumar N, Layland J, Walker SJ, Kentish JC, Shah AM, Cave AC: **Protein phosphatase 2A contributes to the cardiac dysfunction induced by endotoxemia.** *Cardiovasc Res* 2009, **82**(1):67-76.
181. Rudiger A, Singer M: **Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction.** *Critical care medicine* 2007, **35**(6):1599-1608.
182. Shepherd RE, Lang CH, McDonough KH: **Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin.** *Am J Physiol* 1987, **252**(2 Pt 2):H410-416.
183. Tang C, Liu MS: **Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis.** *Am J Physiol* 1996, **270**(1 Pt 2):R254-263.
184. Matsuda N, Hattori Y, Akaishi Y, Suzuki Y, Kemmotsu O, Gando S: **Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits.** *Anesthesiology* 2000, **93**(6):1465-1473.
185. Bohm M, Kirchmayr R, Gierschik P, Erdmann E: **Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure.** *The American journal of medicine* 1995, **98**(2):183-186.
186. Wang Y, Wang Y, Yang D, Yu X, Li H, Lv X, Lu D, Wang H: **beta(1)-adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and IkappaBalpha phosphorylation.** *Critical care (London, England)* 2015, **19**:76.
187. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS: **Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway.** *Circulation* 1998, **98**(13):1329-1334.
188. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G: **Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the**

- myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock.** *Critical care medicine* 2006, **34**(2):307-313.
189. Hare JM, Loh E, Creager MA, Colucci WS: **Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction.** *Circulation* 1995, **92**(8):2198-2203.
190. Agarwal SK, Marshall GD, Jr.: **Beta-adrenergic modulation of human type-1/type-2 cytokine balance.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2000, **105**(1 Pt 1):91-98.
191. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F, Kober L, Dela F: **Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction.** *European journal of heart failure* 2013, **15**(2):150-157.
192. An J, Du J, Wei N, Guan T, Camara AK, Shi Y: **Differential sensitivity to LPS-induced myocardial dysfunction in the isolated brown Norway and Dahl S rat hearts: roles of mitochondrial function, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production.** *Shock* 2012, **37**(3):325-332.
193. Zang Q, Maass DL, Tsai SJ, Horton JW: **Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis.** *Surgical infections* 2007, **8**(1):41-54.
194. Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, Tatro L, Piantadosi CA: **Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis.** *Cardiovasc Res* 2004, **64**(2):279-288.
195. Brand MD, Esteves TC: **Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3.** *Cell metabolism* 2005, **2**(2):85-93.
196. Roshon MJ, Kline JA, Thornton LR, Watts JA: **Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat.** *Shock* 2003, **19**(6):570-576.

197. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S *et al*: **Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins.** *Nature* 2002, **415**(6867):96-99.
198. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ: **The permeability transition pore complex: another view.** *Biochimie* 2002, **84**(2-3):153-166.
199. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulain O, Chopin C, Formstecher P, Neviere R: **Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002, **165**(4):449-455.
200. Tavener SA, Long EM, Robbins SM, McRae KM, Van Remmen H, Kubes P: **Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia.** *Circulation research* 2004, **95**(7):700-707.
201. Liu L, Wang Y, Cao ZY, Wang MM, Liu XM, Gao T, Hu QK, Yuan WJ, Lin L: **Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2015.
202. Fallach R, Shainberg A, Avlas O, Fainblut M, Chepurko Y, Porat E, Hochhauser E: **Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia.** *J Mol Cell Cardiol* 2010, **48**(6):1236-1244.
203. Boehm O, Knuefermann P, Plueck J, Schwederski M, Ehrentraut H, Kebir S, Lohner R, Velten M, Morath S, Koch A *et al*: **TLR2 stimulation induces cardiac inflammation but not cardiac depression in vivo.** *Journal of inflammation (London, England)* 2013, **10**(1):33.
204. Zou L, Feng Y, Chen YJ, Si R, Shen S, Zhou Q, Ichinose F, Scherrer-Crosbie M, Chao W: **Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis.** *Critical care medicine* 2010, **38**(5):1335-1342.

205. Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Nakamori Y, Noborio M, Shiozaki T, Nishino M, Kuwagata Y, Shimazu T *et al*: **Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis.** *The Journal of trauma* 2001, **51**(6):1104-1109.
206. Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, Baumgarten G, Trial J, Knowlton AA: **Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis.** *Circulation research* 2009, **105**(12):1186-1195.
207. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE: **Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum.** *The Journal of experimental medicine* 1996, **183**(3):949-958.
208. Joulin O, Petillot P, Labalette M, Lancel S, Neviere R: **Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction.** *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2007, **56**(3):291-297.
209. Kumar A, Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Parrillo JE: **Transforming growth factor-beta1 blocks in vitro cardiac myocyte depression induced by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and human septic shock serum.** *Critical care medicine* 2007, **35**(2):358-364.
210. Schulz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD: **The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha.** *Br J Pharmacol* 1995, **114**(1):27-34.
211. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW: **Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-**

- conditioned medium.** *The Journal of clinical investigation* 1993, **91**(5):2314-2319.
212. Joe EK, Schussheim AE, Longrois D, Maki T, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL: **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**(2):303-315.
213. Hammond J, Balligand JL: **Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling.** *J Mol Cell Cardiol* 2012, **52**(2):330-340.
214. Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE: **Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility.** *Am J Physiol* 1999, **276**(1 Pt 2):R265-276.
215. Takimoto E: **Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes.** *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2012, **76**(8):1819-1825.
216. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R: **Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure.** *Circulation research* 2000, **87**(3):241-247.
217. Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggiaro FP: **Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction.** *Shock* 2007, **27**(1):10-18.
218. Lancel S, Joulin O, Favory R, Goossens JF, Kluza J, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P, Neviere R: **Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction.** *Circulation* 2005, **111**(20):2596-2604.



219. Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, Formstecher P, Neviere R: **Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2001, **280**(4):H1608-1614.
220. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P: **Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(1):218-225.
221. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ: **Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(9):6252-6256.
222. Neviere R, Hassoun SM, Decoster B, Bouazza Y, Montaigne D, Marechal X, Marciniak C, Marchetti P, Lancel S: **Caspase-dependent protein phosphatase 2A activation contributes to endotoxin-induced cardiomyocyte contractile dysfunction.** *Critical care medicine* 2010, **38**(10):2031-2036.
223. Carlson DL, Willis MS, White DJ, Horton JW, Giroir BP: **Tumor necrosis factor-alpha-induced caspase activation mediates endotoxin-related cardiac dysfunction.** *Critical care medicine* 2005, **33**(5):1021-1028.
224. Dhanantwari P, Nadaraj S, Kenessey A, Chowdhury D, Al-Abed Y, Miller EJ, Ojamaa K: **Macrophage migration inhibitory factor induces cardiomyocyte apoptosis.** *Biochemical and biophysical research communications* 2008, **371**(2):298-303.
225. Obata T, Brown GE, Yaffe MB: **MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway.** *Critical care medicine* 2000, **28**(4 Suppl):N67-77.

226. Alhamdi Y, Abrams ST, Cheng Z, Jing S, Su D, Liu Z, Lane S, Welters I, Wang G, Toh CH: **Circulating Histones Are Major Mediators of Cardiac Injury in Patients With Sepsis.** *Critical care medicine* 2015, **43**(10):2094-2103.
227. Kimmoun A, Ducrocq N, Levy B: **Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock.** *Current vascular pharmacology* 2013, **11**(2):139-149.
228. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S *et al*: **Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure.** *Circulation research* 1986, **59**(3):297-309.
229. Germack R, Dickenson JM: **Induction of beta3-adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2006, **316**(1):392-402.
230. de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D: **Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis.** *Critical care (London, England)* 2009, **13**(5):230.
231. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE: **Cell death.** *The New England journal of medicine* 2009, **361**(16):1570-1583.
232. Zhu W, Woo AY, Yang D, Cheng H, Crow MT, Xiao RP: **Activation of CaMKII $\delta$  is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(14):10833-10839.
233. Koumi S, Backer CL, Arentzen CE, Sato R: **beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular**

- myocytes. **Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(6):2870-2881.
234. Dorian P: **Antiarrhythmic action of beta-blockers: potential mechanisms.** *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 2005, **10 Suppl 1**:S15-22.
235. Du XJ, Feng X, Gao XM, Tan TP, Kiriazis H, Dart AM: **I(f) channel inhibitor ivabradine lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities.** *British journal of pharmacology* 2004, **142**(1):107-112.
236. Beanlands RS, Nahmias C, Gordon E, Coates G, deKemp R, Firnau G, Fallen E: **The effects of beta(1)-blockade on oxidative metabolism and the metabolic cost of ventricular work in patients with left ventricular dysfunction: A double-blind, placebo-controlled, positron-emission tomography study.** *Circulation* 2000, **102**(17):2070-2075.
237. Woo AY, Xiao RP: **beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside.** *Acta pharmacologica Sinica* 2012, **33**(3):335-341.
238. Gonzalez-Munoz C, Fuente T, Hernandez-Cascales J: **Phosphodiesterases inhibition unmask a positive inotropic effect mediated by beta2-adrenoceptors in rat ventricular myocardium.** *Eur J Pharmacol* 2009, **607**(1-3):151-155.
239. Schafers RF, Adler S, Daul A, Zeitler G, Vogelsang M, Zerkowski HR, Brodde OE: **Positive inotropic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist terbutaline in the human heart: effects of long-term beta 1-adrenoceptor antagonist treatment.** *Journal of the American College of Cardiology* 1994, **23**(5):1224-1233.
240. Fujita T, Ishikawa Y: **Apoptosis in heart failure. -The role of the beta-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated**

- signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes.** *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2011, **75**(8):1811-1818.
241. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP: **Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(4):1607-1612.
242. Duronio V: **The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway.** *The Biochemical journal* 2008, **415**(3):333-344.
243. Wang Y, Yuan J, Qian Z, Zhang X, Chen Y, Hou X, Zou J: **beta2 adrenergic receptor activation governs cardiac repolarization and arrhythmogenesis in a guinea pig model of heart failure.** *Scientific reports* 2015, **5**:7681.
244. Singh S, Schwarz K, Horowitz J, Frenneaux M: **Cardiac energetic impairment in heart disease and the potential role of metabolic modulators: a review for clinicians.** *Circulation Cardiovascular genetics* 2014, **7**(5):720-728.
245. Philipson LH: **beta-Agonists and metabolism.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002, **110**(6 Suppl):S313-317.
246. Sakamoto K, Holman GD: **Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2008, **295**(1):E29-37.
247. Perez-Schindler J, Philp A, Baar K, Hernandez-Cascales J: **Regulation of contractility and metabolic signaling by the beta2-adrenergic receptor in rat ventricular muscle.** *Life sciences* 2011, **88**(19-20):892-897.
248. Li J, Yan B, Huo Z, Liu Y, Xu J, Sun Y, Liu Y, Liang D, Peng L, Zhang Y *et al*: **beta2- but not beta1-adrenoceptor activation modulates intracellular oxygen availability.** *J Physiol* 2010, **588**(Pt 16):2987-2998.

249. Zhang W, Yano N, Deng M, Mao Q, Shaw SK, Tseng YT: **beta-Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades.** *PloS one* 2011, **6**(10):e26581.
250. Summers RJ, Kompa A, Roberts SJ: **Beta-adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms.** *Journal of autonomic pharmacology* 1997, **17**(6):331-343.
251. Rozec B, Gauthier C: **beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies.** *Pharmacology & therapeutics* 2006, **111**(3):652-673.
252. Moens AL, Yang R, Watts VL, Barouch LA: **Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system.** *J Mol Cell Cardiol* 2010, **48**(6):1088-1095.
253. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES: **The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system.** *Pharmacological reviews* 2000, **52**(4):595-638.
254. Landmann R: **Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations.** *European journal of clinical investigation* 1992, **22 Suppl 1**:30-36.
255. Madden KS, Sanders VM, Felten DL: **Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 1995, **35**:417-448.
256. Chrousos GP, Gold PW: **The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis.** *JAMA* 1992, **267**(9):1244-1252.
257. Chrousos GP: **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.** *The New England journal of medicine* 1995, **332**(20):1351-1362.

258. Ignatowski TA, Gallant S, Spengler RN: **Temporal regulation by adrenergic receptor stimulation of macrophage (M phi)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post-LPS challenge.** *Journal of neuroimmunology* 1996, **65**(2):107-117.
259. Kamikawa H, Hori T, Nakane H, Aou S, Tashiro N: **IL-1beta increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate.** *Am J Physiol* 1998, **275**(3 Pt 2):R803-810.
260. Blennerhassett MG, Bienenstock J: **Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro.** *Journal of neurobiology* 1998, **35**(2):173-182.
261. Elenkov IJ, Hasko G, Kovacs KJ, Vizi ES: **Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha- and beta-adrenergic drugs in mice.** *Journal of neuroimmunology* 1995, **61**(2):123-131.
262. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Salzman AL, Vizi ES: **Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice.** *Journal of neuroimmunology* 1998, **88**(1-2):57-61.
263. Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, Aguirre-Hernandez R, Thain KR, Thair SA, Nakada E, McConechy M, Walley KR: **beta2-Adrenergic receptor gene polymorphism is associated with mortality in septic shock.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010, **181**(2):143-149.
264. Sekut L, Champion BR, Page K, Menius JA, Jr., Connolly KM: **Anti-inflammatory activity of salmeterol: down-regulation of cytokine production.** *Clinical and experimental immunology* 1995, **99**(3):461-466.
265. Ozogul B, Halici Z, Cadirci E, Karagoz E, Bayraktutan Z, Yayla M, Akpınar E, Atamanalp SS, Unal D, Karamese M: **Comparative study on effects of nebulized**

- and oral salbutamol on a cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats.** *Drug research* 2015, **65**(4):192-198.
266. Yin F, Wang YY, Du JH, Li C, Lu ZZ, Han C, Zhang YY: **Noncanonical cAMP pathway and p38 MAPK mediate beta2-adrenergic receptor-induced IL-6 production in neonatal mouse cardiac fibroblasts.** *J Mol Cell Cardiol* 2006, **40**(3):384-393.
267. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L, Flood PM: **Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms.** *Cellular signalling* 2007, **19**(2):251-260.
268. Grisanti LA, Evanson J, Marchus E, Jorissen H, Woster AP, DeKrey W, Sauter ER, Combs CK, Porter JE: **Pro-inflammatory responses in human monocytes are beta1-adrenergic receptor subtype dependent.** *Molecular immunology* 2010, **47**(6):1244-1254.
269. Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL: **Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1990, **145**(5):1430-1434.
270. Le Tulzo Y, Shenkar R, Kaneko D, Moine P, Fantuzzi G, Dinarello CA, Abraham E: **Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor-kappaB regulation and cytokine expression.** *The Journal of clinical investigation* 1997, **99**(7):1516-1524.
271. Elenkov IJ, Chrousos GP: **Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002, **966**:290-303.

272. Grailer JJ, Haggadone MD, Sarma JV, Zetoune FS, Ward PA: **Induction of M2 regulatory macrophages through the beta2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury.** *Journal of innate immunity* 2014, **6**(5):607-618.
273. Bangalore S, Messerli FH, Kostis JB, Pepine CJ: **Cardiovascular protection using beta-blockers: a critical review of the evidence.** *J Am Coll Cardiol* 2007, **50**(7):563-572.
274. Chen WL, Kuo CD: **Characteristics of heart rate variability can predict impending septic shock in emergency department patients with sepsis.** *Acad Emerg Med* 2007, **14**(5):392-397.
275. Jafri SM, Lavine S, Field BE, Bahoroziyan MT, Carlson RW: **Left ventricular diastolic function in sepsis.** *Critical care medicine* 1990, **18**(7):709-714.
276. Munt B, Jue J, Gin K, Fenwick J, Tweeddale M: **Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study.** *Critical care medicine* 1998, **26**(11):1829-1833.
277. Hartmann B, Junger A, Rohrig R, Klasen J, Jost A, Benson M, Braun H, Fuchs C, Hempelmann G: **Intra-operative tachycardia and peri-operative outcome.** *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 2003, **388**(4):255-260.
278. Palatini P, Benetos A, Julius S: **Impact of increased heart rate on clinical outcomes in hypertension: implications for antihypertensive drug therapy.** *Drugs* 2006, **66**(2):133-144.
279. Reich DL, Bennett-Guerrero E, Bodian CA, Hossain S, Winfree W, Krol M: **Intraoperative tachycardia and hypertension are independently associated with adverse outcome in noncardiac surgery of long duration.** *Anesth Analg* 2002, **95**(2):273-277, table of contents.



280. Landesburg G, Zhou W, Aversano T: **Tachycardia-induced subendocardial necrosis in acutely instrumented dogs with fixed coronary stenosis.** *Anesth Analg* 1999, **88**(5):973-979.
281. Templin C, Ghadri JR, Diekmann J, Napp LC, Bataiosu DR, Jaguszewski M, Cammann VL, Sarcon A, Geyer V, Neumann CA *et al*: **Clinical Features and Outcomes of Takotsubo (Stress) Cardiomyopathy.** *The New England journal of medicine* 2015, **373**(10):929-938.
282. Shawa H, Bajaj M, Cunningham GR: **Pheochromocytoma-induced atrial tachycardia leading to cardiogenic shock and cardiac arrest: resolution with atrioventricular node ablation and pacemaker placement.** *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 2014, **41**(6):660-663.
283. Flam B, Broome M, Frenckner B, Branstrom R, Bell M: **Pheochromocytoma-Induced Inverted Takotsubo-Like Cardiomyopathy Leading to Cardiogenic Shock Successfully Treated With Extracorporeal Membrane Oxygenation.** *Journal of intensive care medicine* 2015, **30**(6):365-372.
284. Burniston JG, Ellison GM, Clark WA, Goldspink DF, Tan LB: **Relative toxicity of cardiotoxic agents: some induce more cardiac and skeletal myocyte apoptosis and necrosis in vivo than others.** *Cardiovascular toxicology* 2005, **5**(4):355-364.
285. Kumar A, Jenkins LA, Perez-Verdia A, Roongsritong C: **Transient left ventricular apical ballooning during dobutamine myocardial perfusion imaging.** *International journal of cardiology* 2008, **124**(3):378-380.
286. Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Pehle B, Schedlowski M, Exton MS: **Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis.** *Neuroimmunomodulation* 2004, **11**(4):214-223.

287. Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J: **Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats.** *Critical care medicine* 2005, **33**(10):2294-2301.
288. Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R: **beta-Adrenergic blockade during systemic inflammation: impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis.** *Resuscitation* 2007, **72**(2):286-294.
289. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV: **Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats.** *Critical care medicine* 2010, **38**(2):388-394.
290. Aboab J, Sebille V, Jourdain M, Mangalaboyi J, Gharbi M, Mansart A, Annane D: **Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock.** *Intensive care medicine* 2011, **37**(8):1344-1351.
291. Mori K, Morisaki H, Yajima S, Suzuki T, Ishikawa A, Nakamura N, Innami Y, Takeda J: **Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function.** *Intensive care medicine* 2011, **37**(11):1849-1856.
292. Calzavacca P, Lankadeva YR, Bailey SR, Bailey M, Bellomo R, May CN: **Effects of selective beta1-adrenoceptor blockade on cardiovascular and renal function and circulating cytokines in ovine hyperdynamic sepsis.** *Critical care (London, England)* 2014, **18**(6):610.
293. Ibrahim-Zada I, Rhee P, Gomez CT, Weller J, Friese RS: **Inhibition of sepsis-induced inflammatory response by beta1-adrenergic antagonists.** *J Trauma Acute Care Surg* 2014, **76**(2):320-327; discussion 327-328.

294. Jacquet-Lagrece M, Allaouchiche B, Restagno D, Paquet C, Ayoub JY, Etienne J, Vandenesch F, Dauwalder O, Bonnet JM, Junot S: **Gut and sublingual microvascular effect of esmolol during septic shock in a porcine model.** *Critical care (London, England)* 2015, **19**:241.
295. Gore DC, Wolfe RR: **Hemodynamic and metabolic effects of selective beta1 adrenergic blockade during sepsis.** *Surgery* 2006, **139**(5):686-694.
296. Prielipp RC, MacGregor DA, Butterworth JFt, Meredith JW, Levy JH, Wood KE, Coursin DB: **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of milrinone administration to increase oxygen delivery in critically ill patients.** *Chest* 1996, **109**(5):1291-1301.
297. Schmittinger CA, Dunser MW, Haller M, Ulmer H, Luckner G, Torgersen C, Jochberger S, Hasibeder WR: **Combined milrinone and enteral metoprolol therapy in patients with septic myocardial depression.** *Critical care (London, England)* 2008, **12**(4):R99.
298. Balik M, Rulisek J, Leden P, Zakharchenko M, Otahal M, Bartakova H, Korinek J: **Concomitant use of beta-1 adrenoreceptor blocker and norepinephrine in patients with septic shock.** *Wien Klin Wochenschr* 2012, **124**(15-16):552-556.
299. Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, Orecchioni A, D'Egidio A, D'Ippoliti F, Raffone C *et al*: **Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial.** *JAMA* 2013, **310**(16):1683-1691.
300. Bougle A, Mira JP: **Short-acting beta-blocker administration in patients with septic shock.** *JAMA* 2014, **311**(7):736-737.
301. Cortes DO, Taccone FS, Vincent JL: **Short-acting beta-blocker administration in patients with septic shock.** *JAMA* 2014, **311**(7):735-736.

302. Lin GM: **Short-acting beta-blocker administration in patients with septic shock.** *JAMA* 2014, **311**(7):737.
303. Lira A, Pinsky MR: **Should beta-blockers be used in septic shock?** *Critical care (London, England)* 2014, **18**(3):304.
304. Morelli A, Ertmer C, Singer M: **Short-acting beta-blocker administration in patients with septic shock--reply.** *JAMA* 2014, **311**(7):737-738.
305. Orbegozo Cortes D, Njimi H, Dell'Anna AM, Taccone FS: **Esmolol for septic shock: more than just heart rate control?** *Minerva anesthesiologica* 2014, **80**(2):254-258.
306. Sanfilippo F, Santonocito C, Maybauer MO: **Short-acting beta-blocker administration in patients with septic shock.** *JAMA* 2014, **311**(7):736.
307. Pemberton P, Veenith T, Snelson C, Whitehouse T: **Is It Time to Beta Block the Septic Patient?** *BioMed research international* 2015, **2015**:424308.
308. Kerhof PL, Baan J: **Peak left ventricular systolic pressure/end-systolic volume ratio.** *The American journal of cardiology* 1980, **46**(3):528-529.
309. Suga H, Sagawa K, Shoukas AA: **Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio.** *Circulation research* 1973, **32**(3):314-322.
310. Kass DA, Yamazaki T, Burkhoff D, Maughan WL, Sagawa K: **Determination of left ventricular end-systolic pressure-volume relationships by the conductance (volume) catheter technique.** *Circulation* 1986, **73**(3):586-595.
311. Ducrocq N, Kimmoun A, Furmaniuk A, Hekalo Z, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Levy B: **Comparison of equipressor doses of norepinephrine, epinephrine, and phenylephrine on septic myocardial dysfunction.** *Anesthesiology* 2012, **116**(5):1083-1091.

312. Angus JA, Wright CE: **Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels.** *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2000, **44**(2):395-407.
313. Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, Cattan V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramarosan A, Regnault V *et al*: **Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress.** *Critical care medicine* 2009, **37**(1):246-255.
314. Morelli A, Donati A, Ertmer C, Rehberg S, Kampmeier T, Orecchioni A, D'Egidio A, Cecchini V, Landoni G, Pietropaoli P *et al*: **Microvascular Effects of Heart Rate Control With Esmolol in Patients With Septic Shock: A Pilot Study.** *Critical care medicine* 2013.
315. Boost KA, Flondor M, Hofstetter C, Platacis I, Stegwerth K, Hoegl S, Nguyen T, Muhl H, Zwissler B: **The beta-adrenoceptor antagonist propranolol counteracts anti-inflammatory effects of isoflurane in rat endotoxemia.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2007, **51**(7):900-908.
316. Pauschinger M, Rutschow S, Chandrasekharan K, Westermann D, Weitz A, Peter Schwimmbeck L, Zeichhardt H, Poller W, Noutsias M, Li J *et al*: **Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response.** *European journal of heart failure* 2005, **7**(4):444-452.
317. Brown MA, Jones WK: **NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2004, **9**:1201-1217.

318. Joyce DE, Grinnell BW: **Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB.** *Critical care medicine* 2002, **30**(5 Suppl):S288-293.
319. Sun Z, Andersson R: **NF-kappaB activation and inhibition: a review.** *Shock (Augusta, Ga)* 2002, **18**(2):99-106.
320. Schmidt C, Kurt B, Hoherl K, Bucher M: **Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis.** *Shock (Augusta, Ga)* 2009, **32**(3):239-246.
321. Kuipers S, Klein Klouwenberg PM, Cremer OL: **Incidence, risk factors and outcomes of new-onset atrial fibrillation in patients with sepsis: a systematic review.** *Crit Care* 2014, **18**(6):688.
322. Sander O, Welters ID, Foex P, Sear JW: **Impact of prolonged elevated heart rate on incidence of major cardiac events in critically ill patients with a high risk of cardiac complications.** *Critical care medicine* 2005, **33**(1):81-88; discussion 241-242.
323. Scheruebel S, Koyani CN, Hallstrom S, Lang P, Platzer D, Machler H, Lohner K, Malle E, Zorn-Pauly K, Pelzmann B: **I(f) blocking potency of ivabradine is preserved under elevated endotoxin levels in human atrial myocytes.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014, **72**:64-73.
324. Worthley LI, Holt AW: **Digoxin in the critically ill patient.** *Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine* 1999, **1**(3):252-264.
325. De Santis V, Frati G, Greco E, Tritapepe L: **Ivabradine: a preliminary observation for a new therapeutic role in patients with multiple organ dysfunction syndrome.** *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2014, **103**(10):831-834.

326. Nuding S, Ebel H, Hoke RS, Krummenerl A, Wienke A, Muller-Werdan U, Werdan K: **Reducing elevated heart rate in patients with multiple organ dysfunction syndrome by the I (f) (funny channel current) inhibitor ivabradine : MODI (f)Y trial.** *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2011, **100**(10):915-923.
327. Gallet R, Ternacle J, Damy T, Guendouz S, Bremont C, Seemann A, Gueret P, Dubois-Rande JL, Lim P: **Hemodynamic effects of Ivabradine in addition to dobutamine in patients with severe systolic dysfunction.** *International journal of cardiology* 2014, **176**(2):450-455.
328. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG: **Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats.** *Cardiovasc Res* 2002, **55**(2):329-340.
329. Deten A, Volz HC, Holzl A, Briest W, Zimmer HG: **Effect of propranolol on cardiac cytokine expression after myocardial infarction in rats.** *Mol Cell Biochem* 2003, **251**(1-2):127-137.
330. Neukirchen M, Kienbaum P: **Sympathetic nervous system: evaluation and importance for clinical general anesthesia.** *Anesthesiology* 2008, **109**(6):1113-1131.

## Annexe 1 : Corticoïdes et choc septique



# Corticoïdes et choc septique

A. KIMMOUN, C. RODAIX, D. ANNANE

La définition actuelle du sepsis sévère grave comprend un syndrome de réponse inflammatoire systémique associé à une atteinte infectieuse d'un organe et à une défaillance hémodynamique à type d'hypoperfusion ou d'hypotension systémique. L'absence de réponse à l'expansion volémique confirme l'évolution vers le choc septique. En réanimation, l'incidence du choc septique, évaluée autour de 17 %, apparaît en constante augmentation [1]. Avec une mortalité de 42 %, c'est par ailleurs la première cause de décès en réanimation. Enfin, aux États-Unis, le choc septique est responsable d'autant de décès que l'infarctus du myocarde à sa phase aiguë [2]. Cependant, une nette amélioration de la survie est aussi régulièrement constatée au décours des études épidémiologiques européennes ou nord-américaines. Elle est probablement autant attribuable aux évolutions de la prise en charge qu'à l'appropriation par tous d'un arsenal thérapeutique dédié comme le sont les corticoïdes [3]. L'adoption de la corticothérapie chez ces patients en choc septique, dépendants des catécholamines, repose aujourd'hui sur un rationnel scientifique fort, en constante réévaluation. Cet article résume l'évolution des connaissances, tant expérimentales que chez l'homme, sur l'utilisation des corticoïdes au cours du choc septique et propose une conduite thérapeutique sur son instauration.

## Effets anti-inflammatoires des corticoïdes

Deux types d'action des corticostéroïdes peuvent être individualisés. D'une part, les effets génomiques qui sont médiés par le récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes. D'autre part, plus récemment identifiés, les effets non génomiques pouvant être eux-mêmes divisés en trois modes d'action :

- médiation par un récepteur aux glucocorticoïdes (RG) [4] ;
- interaction non spécifique avec la membrane cellulaire [4] ;
- interaction spécifique avec un récepteur membranaire aux glucocorticoïdes [5].

## Effets génomiques médiés par le récepteur aux glucocorticoïdes

Le RG est une protéine de 94 kD de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, ubiquitaire, présentant de nombreux isoformes.  $RG\alpha$  est la forme se liant aux glucocorticoïdes tandis que  $RG\beta$  a probablement une fonction inhibitrice sur  $RG\alpha$  en créant un hétéro dimère inactif  $RG\alpha/RG\beta$  [6]. Le RG comprend trois domaines ayant différentes fonctions :

- une extrémité N-terminale avec une fonction de transactivation ;
- un domaine de liaison à l'ADN ;
- un domaine hydrophobe de liaison au ligand.

Les corticostéroïdes traversent la membrane cytosolique grâce à leurs caractéristiques lipophiles. Le récepteur est, dans sa forme inactive, localisé dans le cytoplasme de la cellule où il est lié à des molécules chaperonnes HSP (*Heat Shock Protein*), une immunophiline et d'autres

*Correspondance* : Service de Réanimation, Hôpital Raymond Poincaré (AP-HP), Université de Versailles SQ, 92380 Garches, France, e-mail : djillali.annane@rpc.aphp.fr

protéines encore inconnues [7, 8]. Après fixation du ligand au récepteur, le complexe se dissocie des protéines HSP permettant l'exposition de ses domaines de liaison à l'ADN. Le RG activé, composé du récepteur et de son ligand, est transporté dans le noyau où il exerce son activité sous forme d'homodimère sur certains gènes spécifiques, positivement par transactivation ou négativement par transrépression [9, 10].

La transactivation permet la promotion de la transcription de certains gènes par l'interaction du domaine de liaison du récepteur activé à des séquences promotrices spécifiques GREs (*glucocorticoid responsive elements*). Cette activation des GREs positifs induit la synthèse de nombreuses protéines anti-inflammatoires comme la lipocortine 1 et IκB [11-13]. À l'inverse, la transcription de gènes de l'inflammation comme l'interleukine 1 (IL-1) ou l'interleukine 2 (IL-2) peut aussi être réprimée par l'interaction directe du RG activé avec des GREs négatifs [14].

La transrépression correspond à l'inhibition de facteurs de transcription de gènes pro-inflammatoires par le RG activé. Les principales cibles de cette régulation négative sont les cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1, l'IL-2, le TNF-α et l'IFN-γ et les prostaglandines. Les mécanismes d'action de cette régulation négative sont principalement de type protéine/protéine entre le RG activé et le facteur de transcription masquant ses sites de liaison spécifique à l'ADN. La synthèse d'IκB précédemment décrite participe aussi à la transrépression en empêchant la translocation nucléaire de NF-κB et sa fixation sur la séquence NF-κB *responsive element* [15]. Le RG activé bloque aussi la région promotrice des gènes pro-inflammatoires dont l'activation est assurée par NF-κB. Enfin, le RG activé peut entrer en compétition directe avec les facteurs de transcription comme AP-1 pour la fixation des co-activateurs nucléaires nécessaires à leur liaison à l'ADN, empêchant ainsi la promotion de gènes pro-inflammatoires [16].

L'activation du RG, sa translocation dans le noyau de la cellule, sa liaison aux GREs, la transcription et la synthèse protéique interviennent dans un délai allant de plusieurs heures à plusieurs jours et les effets constatables sur les organes de plusieurs jours à plusieurs semaines. Pourtant, les effets cliniques de la corticothérapie dans certaines situations comme dans le choc septique sont particulièrement rapides et ne peuvent donc être expliqués simplement par le modèle d'action génomique.

### **Effets non génomiques**

Les effets non génomiques sont de découverte récente et proposent une explication à la rapidité des effets immuno-modulateurs et anti-inflammatoires de la corticothérapie (Fig. 1).

#### ***Effets non génomiques médiés par le récepteur aux glucocorticoïdes***

Le RG, dans sa forme inactive, est retenu dans le cytoplasme par un complexe multiprotéique masquant ses sites de liaison à l'ADN. Cet ensemble comprend entre autres les HSP et une série de kinases de la famille du système de signalisation MAPK dont fait partie Src. Lors de l'activation du RG, outre la libération du site de liaison à l'ADN œuvrant pour les effets génomiques, Src est libéré du complexe HSP90. Src inhibe très rapidement le relargage de l'acide arachidonique de la voie de la phospholipase A2 (PLA2) en stimulant l'activation de la lipocortine 1, tous deux importants médiateurs de la synthèse des leucotriènes proinflammatoires [4]. Enfin, les glucocorticoïdes inhibent deux enzymes clefs de la réponse inflammatoire : iNOS (*inductible nitric oxide synthase*) responsable de la production de NO et la COX-2 (cyclo-oxygénase 2).

#### ***Effets non génomiques par interactions non spécifiques avec la membrane cellulaire***

Les glucocorticoïdes peuvent interagir rapidement avec les membranes cellulaires cytosoliques et mitochondriales. Ils s'intercalent dans la membrane phospholipidique, modifiant ses propriétés physico-chimiques et ses interactions membrane-protéines [17]. En diminuant les flux trans-membranaires de sodium dans les cellules de l'immunité, les glucocorticoïdes participent à une immuno-suppression rapide et à une diminution de la réponse inflammatoire [18]. Il semblerait aussi que la production d'ATP soit diminuée dans les mitochondries des cellules immunes, altérant ainsi la réponse inflammatoire et anti-infectieuse.

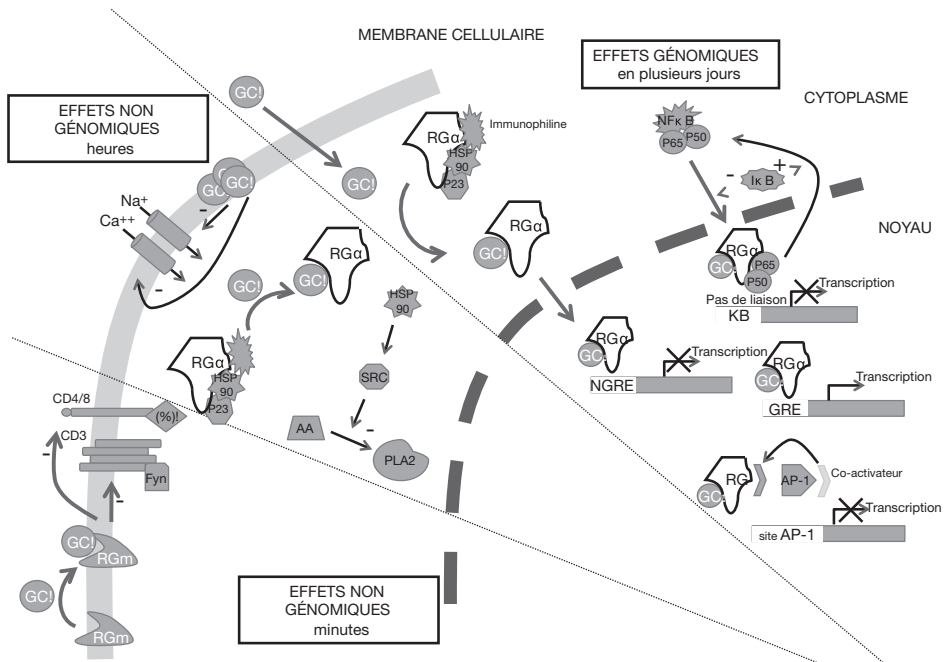


Fig. 1.- Principaux mécanismes d'action génomiques et non génomiques des corticoïdes. GC: glucocorticoïde, RGα: récepteur au glucocorticoïde α (l'«homo-dimérisation n'est pas représentée à visée simplifiée»), NGRE: *negative glucocorticoïde responsive element*, GRE: *glucocorticoïde responsive element*, NF κB: nuclear factor κB, HSP 90: *heat shock protein*, AA: acide arachidonique, PLA2: phospholipase A2, Iκ B: inhibiteur κ B, AP-1: *activator protein-1*.

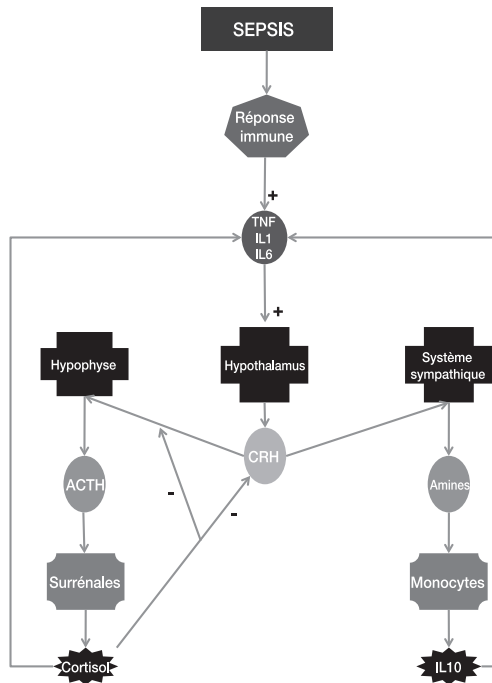


Fig. 2.- Réponse neuroendocrine au sepsis.

### **Effets non génomiques par interactions spécifiques avec un récepteur membranaire aux glucocorticoïdes**

Les récepteurs membranaires aux glucocorticoïdes sont de découverte récente, mis en évidence sur les monocytes circulants par immunofluorescence. Ils sont structurellement différents des récepteurs cytosoliques et leur origine reste encore incertaine. Dans les pathologies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante, le nombre de RG membranaires est fortement augmenté sur les cellules de l'immunité comme les monocytes ou les lymphocytes B [19]. Leur nombre, en particulier dans la polyarthrite rhumatoïde, peut d'ailleurs être un stigmate de l'activité de la maladie. L'une des hypothèses suggérées est que leur surexpression à la surface des cellules est un mécanisme protecteur dans ces situations inflammatoires chroniques.

Les effets immunosuppresseurs ont récemment été expliqués par la découverte, chez les lymphocytes T, des kinases p56lck (Lck) et p59fyn (Fyn), de la famille des tyrosines kinases Src, cibles cytosoliques des RG membranaires activés. Directement impliquées dans la transduction du signal des récepteurs lymphocytaires T, ces kinases jouent un rôle crucial dans la qualité de la transmission de l'activation lymphocytaire. Lck s'associe avec les corécepteurs CD4 ou CD8 tandis que Fyn est spécifique de CD3. Or, les glucocorticoïdes inhibent *in vitro* l'activité de Lck et de Fyn par un mécanisme dépendant du RG activé. Il semble aujourd'hui certain que, dans les lymphocytes T, les RG appartiennent à un complexe protéique incluant HSP 90 mais aussi Lck et Fyn lié étroitement au récepteur lymphocytaire T. Ainsi, la fixation d'un glucocorticoïde au RG disjoint le complexe multiprotéique lié au récepteur lymphocytaire T et redistribue les kinases Fyn et Lck, perturbant ainsi très rapidement la transmission de l'activation lymphocytaire et favorise l'effet immuno-suppresseur des corticoïdes [5].

## **Effets des corticoïdes dans le choc septique**

### **Choc septique et insuffisance surrénalienne aiguë**

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

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

### **Défaillance de l'axe corticotrope**

L'incidence globale de l'insuffisance surrénalienne chez les patients sévères s'élève à 20 % mais atteint plus de 50 % chez les patients en choc septique [20]. Les mécanismes mis en jeu sont complexes et, finalement, assez peu connus. Il existe une synthèse non adaptée à la demande tissulaire de CRH, d'ACTH et de cortisol. Néanmoins, dans certains cas, l'axe peut être physiquement altéré (*Tabl. II*). De même, certains traitements comme l'étomidate, agent anesthésique largement répandu, inhibent les enzymes de la synthèse du cortisol comme la 11- $\beta$ -hydroxylase qui permet la transformation du 11- $\beta$ -désoxycortisol en cortisol [21]. De façon plus anecdotique, le kétoconazole à fortes doses aboutit aux mêmes conséquences [22]. Récemment, la physiopathologie de l'insuffisance surrénalienne relative s'est enrichie de l'implication du relargage de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 au cours du choc septique. Le TNF- $\alpha$  inhibe la stimulation de la synthèse d'ACTH par le CRH [23, 24] et celle du cortisol en bloquant les effets de l'ACTH et de l'angiotensine II sur les cellules surrénaliennes [25]. La diminution de production du cortisol semble aussi en rapport, dans certains états graves septiques, post-opératoires ou chez les brûlés étendus, avec un manque de substrat dont l'HDL [26-28].

## Tableau I

*Effets des glucocorticoïdes sur la synthèse protéique de la transactivation et de la transrépression.*

<b>Transcription activée (transactivation)</b>	<b>Transcription réprimée (transrépression)</b>
Annexine 1 (lipocortine-1, inhibiteur de phospholipase A2)	- Cytokines : IL-1 à IL-6, IL-9, IL-11 à IL-13, IL-16 à IL-18, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, SCF
Récepteur $\beta$ 2-adrénérique	- Chémokines : IL-8, RANTES, MIP-1a, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxines
Inhibiteurs de sécrétion des leucoprotéases	- Molécules d'adhésion : ICAM-1, VCAM-1, E-selectine
CC10 (inhibiteur des phospholipases A2)	- Enzymes pro-inflammatoires : iNOs, COX-2, cPLA2
IL-1 receptor-antagonist	- Récepteurs de l'inflammation :
IL-1 récepteur type I $\kappa$ B-a	récepteurs à la tachykinine NK1 and NK2,
GILZ	récepteurs à la bradykinine $\beta$ 2
MKP-1	- Peptides : endothéline-1
IL-10	

## Tableau II

*Étiologies de l'insuffisance surrénalienne.*

<b>Étiologies de l'insuffisance surrénalienne</b>
Causes réversibles
Sepsis
Traitements
Corticoïdes/Etomidate/Rifampicine/Phénytoïne Ketoconazole
Hypothermie
Insuffisance surrénalienne primaire
Auto-immune
HIV
CMV
Métastases
Poumon/sein/rein
Infection fongiques
Tuberculose
Hémorragie/infarctus
CIVD/SAPL/ <i>Purpura fulminans</i> /Traumatique/Thrombopénie induite à l'héparine
Insuffisance surrénalienne secondaire
Tumeur de la tige pituitaire
Radiothérapie ou chirurgie de la tige pituitaire
Sarcoïdose
Necrose de la tige pituitaire du post-partum
Craniopharyngiome
HIV
Post-traumatique

### **Résistance tissulaire aux corticoïdes**

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

## Impact hémodynamique des corticoïdes durant le choc septique

Les effets hémodynamiques des corticoïdes sur l'élévation de la pression artérielle sont connus depuis fort longtemps. Un traitement prolongé par corticoïde est souvent à l'origine d'une hypertension artérielle tandis qu'à l'inverse, l'hypotension artérielle est l'un des symptômes de l'insuffisance surrénalienne. L'inhibition du cortisol endogène par l'administration de RU486 est responsable, sur un modèle de rat Wistar, d'une baisse de 20 mmHg de la pression artérielle moyenne sans altération du débit cardiaque et témoigne donc essentiellement d'un abaissement des résistances vasculaires périphériques [29]. Toujours dans cette étude, l'inhibition du cortisol par le RU486 s'accompagne d'une hypovaso-réactivité aux catécholamines sans modification de l'activité de la vasopressine. Ces constatations sont probablement plus en rapport avec l'activité glucocorticoïde que minéralocorticoïde étant donné l'absence de modification du bilan sodé par le RU486 et la correction de l'hypovaso-réactivité par l'administration de corticoïde exogène.

Sur un modèle de choc endotoxinique par LPS chez le rat, l'administration concomitante de glibenclamide (inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendants) et de dexaméthasone limite les effets correcteurs du glibenclamide sur la pression artérielle. À l'inverse, l'administration de dexaméthasone seule corrige l'hypotension. Les auteurs concluent que la dexaméthasone limite l'activation des canaux potassiques ATP-dépendants [30]. Cependant, aucune étude n'a par la suite mis en évidence un rôle direct des glucocorticoïdes sur les canaux potassiques ATP-dépendants. L'hypothèse la plus probable est que les glucocorticoïdes, en inhibant NF- $\kappa$ B, bloquent la synthèse de iNOS et ainsi de NO, principal activateur de ces canaux [31]. Par ailleurs, l'inhibition par la dexaméthasone de la conversion de l'acide arachidonique en prostacycline (PGI<sub>2</sub>) par la cyclo-oxygénase 2, au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, participe aussi très probablement à la restauration de la vasoréactivité. Enfin, une étude *in vitro* sur des cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte de rat évoque l'implication du système des phospho-inositides. L'incubation de ces cellules avec du cortisol (0,02 à 5  $\mu$ g/ml) entraîne une augmentation d'inositol-3-phosphate avec libération de calcium du réticulum sarcoplasmique et l'amélioration de la réactivité vasculaire [32].

Ces travaux expérimentaux sont concordants et sont complétés par les résultats des différents essais cliniques menés chez l'homme. Une étude randomisée en *cross over* chez des volontaires masculins montre que les effets vasculaires précoces de l'administration d'hydrocortisone (200 mg sur une période de 3 heures) ne sont pas liés au NO [33]. Ces données chez le sujet sain confortent les résultats antérieurs du travail de Baghat *et al.* où l'hypotension induite par l'injection de LPS chez des volontaires était corrigée par l'administration deux heures avant de 100 mg d'hydrocortisone *per os* [34]. L'utilisation d'inhibiteurs de la COX-2 ou de la NO synthase ne corrigeait pas, là aussi, l'hypovaso-réactivité. Chez les patients en choc septique, la réponse vasculaire à la noradrénaline est rétablie une heure après l'administration de 50 mg d'hydrocortisone en intraveineux [35]. Le même résultat est retrouvé dans un autre travail avec non-implication du système rénine angiotensine ou du monoxyde d'azote [36].

De nombreux essais thérapeutiques randomisés ont été réalisés avec de faibles doses de corticoïdes sur une période prolongée et retrouvent de façon concordante une amélioration de l'hémodynamique périphérique et des résistances vasculaires sans augmentation du débit cardiaque [3, 37-41]. La rapide normalisation (< 3 heures) de la pression artérielle par les corticoïdes oriente vers des mécanismes non génomiques tandis que, dans les suites, l'inhibition d'iNOS participe à l'amélioration de la vasoréactivité.

## Impact anti-inflammatoire des corticoïdes durant le choc septique

Les effets anti-inflammatoires des corticoïdes sont connus depuis fort longtemps. Ils inhibent la synthèse de nombreux facteurs pro-inflammatoires en empêchant par exemple la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et la co-activation de AP-1. Par ailleurs, la migration tissulaire des cellules de l'inflammation est limitée par la diminution de la synthèse des chémokines et des cytokines chimiotactiques [42]. Le processus proinflammatoire est quasi inhibé par les corticostéroïdes, en particulier les interleukines 1, 2, 3 et 6, l'interféron  $\gamma$ , les facteurs de croissance des granuleux et des macrophages et le TNF- $\alpha$ . Les corticoïdes stimulent par ailleurs la synthèse du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) [43]. En favorisant la production de

lipocortine 1, les glucocorticoïdes inhibent la synthèse de phospholipase A2 et, ainsi, la cascade de l'acide arachidonique permettant de réduire la production des leucotriènes pro-inflammatoires [11]. Enfin, la synthèse de la COX-2 [44] et de la NO synthase inductible [45] est aussi inhibée par les corticoïdes.

Chez des volontaires sains, une perfusion de six heures de  $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  d'hydrocortisone juste avant ou par injection d'endotoxine prévient la fièvre, la tachycardie, l'augmentation des taux plasmatiques d'épinéphrine, de CRP, de TNF- $\alpha$  mais pas d'IL-6 [46]. À l'inverse, l'administration d'hydrocortisone, 12 à 144 heures avant l'injection de LPS, augmente le taux de TNF- $\alpha$ , suggérant un effet rebond dû à l'arrêt de la corticothérapie. Parallèlement, les corticoïdes augmentent la synthèse des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-1ra et le sTNF-R I, II.

Au cours du choc septique, l'administration de 300 mg d'hydrocortisone durant cinq jours diminue la température corporelle, la fréquence cardiaque et les taux plasmatiques de PLA2 et de CRP [49]. Dans une étude randomisée, en *cross over* et double aveugle, 40 patients en choc septique ont reçu soit 100 mg en bolus suivis de 10 mg/h d'hydrocortisone pendant trois jours ( $n = 20$ ), soit un placebo ( $n = 20$ ) [40]. Au terme de ces trois jours, les patients recevaient le traitement opposé. La perfusion d'hydrocortisone diminuait les taux circulants d'IL-6, d'IL-8 et d'E-selectine. L'activation des polynucléaires neutrophiles était également réduite avec une diminution de l'expression de CD11b et de CD64. Parallèlement, dans ce travail, la réponse anti-inflammatoire était elle aussi réduite avec une diminution des taux circulants de sTNF-R I, II et d'IL-10. L'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants restait stable. Une autre étude similaire retrouvait les mêmes résultats avec une diminution du taux d'IL-6 sans modification du taux d'IL-10. Ainsi, de faibles doses d'hydrocortisone durant le choc septique diminuent la réponse inflammatoire sans engendrer d'immuno-suppression significative. À l'inverse, l'arrêt de la corticothérapie est responsable dans les deux travaux sus-décrits d'un rebond inflammatoire. L'hydrocortisone, en synergie avec l'IL-15, favorise la prolifération des cellules CD56+ et donc la croissance des lymphocytes NK, confirmant la modulation de l'immunité par la corticothérapie. Complétant les travaux précédents, dans une étude ancillaire française [3] évaluant la corticothérapie dans le choc septique, la réduction du taux d'IL-6 n'a été retrouvée que chez les patients en insuffisance surrénalienne relative non répondeurs à 250  $\mu\text{g}$  de Synacthène® [50]. Enfin, de faibles doses d'hydrocortisone ont permis de diminuer l'hyperexpression inflammatoire tardive par les monocytes circulants de MIF [51].

## Les corticoïdes améliorent-ils la survie durant le choc septique ?

### Études expérimentales

De très nombreux travaux depuis les années 1970 expérimentent, sur des modèles de choc septique, les effets de la corticothérapie sur la survie. Sans chercher l'exhaustivité, nous rapportons les travaux princeps desquels découle le rationnel des études chez l'homme. Méthodologiquement, la recherche de la littérature a été réalisée par l'intermédiaire de la base de donnée Medline avec les termes Mesh suivants : *severe sepsis* ou *septic shock* en association avec *steroid* et en se limitant uniquement à la littérature anglo-saxonne et animale. Sur les 500 références, les revues de la littérature ont été exclues (49 articles) et seuls ont été retenus les abstracts où la survie était mentionnée (38 articles). 10 articles n'ont pas été inclus sur l'absence de version complète (Tabl. III).

La totalité des articles inclus retrouve une amélioration de la survie indépendamment du modèle (endotoxinique, par ligature ponction cœcale ou bactériémique). Les faibles doses de corticoïdes, rapportées en équivalent hydrocortisone, améliorent autant la survie que les fortes doses. Le type de molécule ne change pas le pronostic de survie de même que le type d'animal gros ou petit. Enfin, l'effet minéralo-corticoïde ne semble pas influencer non plus sur la survie.

Néanmoins, ces travaux sont très hétérogènes par les modèles, les posologies, les horaires d'administration des corticoïdes et l'observation de leurs effets très différents. Ainsi, leur comparaison ne peut être que fortement limitée.

## Tableau III

Influence des corticoïdes sur la survie durant l'état de choc septique, études expérimentales.

LPC : Ligature ponction caecale, DEX : Dexaméthasone, PRED : Prednisolone, METH : Méthylprednisolone, DHEA : Déhydroépiandrosterone, HC : Hydrocortisone, IP : Intrapéritonéal, IN : Intranasal, IV : Intraveineux direct, IVL : Intraveineux lent, ESB : Enterotoxine staphylococcique B, ISF : Injection de suspension fécale, ISB : Injection de suspension bactérienne, LPS : Lipopolysaccharide, E. Coli ou équivalent, ELEC : Soluté standard contenant des électrolytes, HEA : Hydroxyéthylamidon, Alb : Albumine, D40 : Dextran 40, D70 : Dextran 70, RL : Ringer Lactate.

Source	Animaux (n)	Corticoïde(s) utilisé(s) et dose(s)/équivalence en HC	Modèle de choc	Moment d'administration du/des corticoïde(s)	Groupes	Objectif(s)	Amélioration de la survie p < 0,05 ?	Résultats secondaires	Biais/avantages
Ciessol 2010 [52]	Rats 100	DEX IP 0,2 et 2 mg/kg / 5 et 50 mg/kg	LPC	Au moment de la LPC puis 1/1 pendant 7 j	Tous traités par ATB Grp 1 : Sham + ELEC Grp 2 : LPC + ELEC Grp 3 : LPC + DEX (0,2 mg/kg) Grp 4 : LPC + DEX (2 mg/kg)	Comparaison de la survie inter groupe à 17 j des troubles de la mémoire, alimentaires, du poids des surrénales	Oui, pour le grp 3 Non, pour le grp 4	Diminution de l'anhédonie (grps 3 et 4), les troubles de la mémoire (grp 3). Prise de poids (grps 3 et 4) Normalisé du poids des surrénales (grps 3 et 4) Diminution des taux de corticostéroïde et d'ACTH (grps 3 et 4)	Pas de choc, traitement dès la LPC
Osachowski <i>et al.</i> 2009 [53]	Souris 88	DEX IP 2,5 mg/kg/prise / 62,5 mg/kg/prise	LPC	8 h et 32 h après LPC	Stratification à 6 h, en fonction du taux d'IL6: > 26 ng/ml : Grp 1 < 26 ng/ml : Grp 2 Dans chaque groupe: 50 % reçoivent la DEX et 50 % le placebo	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j et 28 j, des taux d'IL6, IL1β, IL2, TNFα, (α), IL10, IL1ra, TNFsr à 24 h	Oui, 40 % de survie à 7 et 28, dans le grp 1 avec DEX versus 11 % et 0 % dans le grp 1, sans DEX	La DEX ne fait pas diminuer à 24 h le taux des cytokines pro et anti-inflammatoires, que ce soit dans le grp 1 ou 2	Cibage de la corticothérapie en fonction du statut immunoinflammatoire précoce
Krakauer <i>et al.</i> 2009 [54]	Souris 60	DEX IN IP 1,25 mg/kg/prise, 5 mg/kg/j / IN : 31,2 mg/kg/prise, IP : 125 mg/kg/j	ESB IN et IP	IN à plusieurs temps (cf grps) IP 24 h, 58 h, 72 h et 96 h après ESB	Grp 1 : ESB + DEX en IN à 2 h Grp 2 : ESB + DEX en IN à 2 h et 5 h Grp 3 : ESB + DEX en IN à 3 h Grp 4 : ESB + DEX en IN à 4 h Grp 5 : ESB + DEX en IN à 5 h suivi de DEX en IP pendant 4 j (grps 1 à 5) Grp 6 : ESB	Comparaison de la survie inter groupe à 96 h, des taux sériques d'IL2, IL6, MCP-1 et pulmonaires d'IL1 et INF, IL2, IL6, MCP-1 à 5 et 24 h	Oui, 100 % de survie à 6 à 5 h et 24 h : IL6, IL2 et MCP-1 sériques 70 % dans le grp 3, versus 10 % dans le grp 5	Diminution dans grp 2, versus grp 6 à 5 h et 24 h : IL6, IL2, IL1, INF et MCP-1 pulmonaires	Le moment de l'introduction des corticoïdes est prédominant
Ceinkawa <i>et al.</i> 2009 [55]	Rats 121	MET IV 0,25, 0,5, 2 mg/kg / 1,2, 2,5, 10 mg/kg	ISF IP	A l'apparition des signes cliniques de sepsis	Grp 1 : ISF Grp 2 : ISF + ATB Grp 3 : ISF + MET 0,5 mg/kg Grp 4 : ISF + ATB + MET 0,25 mg/kg Grp 5 : ISF + ATB + MET 0,5 mg/kg Grp 6 : ISF + ATB + MET 2 mg/kg	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j	Oui, 60 % de survie dans le grp 5 à 7 j versus 0 % dans le grp 3	MET à 0,5 mg/kg + ATB donne la meilleure survie	
Fadel <i>et al.</i> 2008 [56]	Souris 60	MET IP 30 mg/kg / 150 mg/kg	ISB IP 3 germes testés: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	1 h ou 4 h après l'ISB	Pour chaque germe: Grp 1 : ISB Grp 2 : ISB + ATB à 2 h Grp 3 : ISB + ATB à 2 h + MET à 4 h Grp 4 : ISB + MET à 1 h + ATB à 2 h 30	Comparaison de la survie inter groupe / 12 h sur 10 j	Oui, pour les BGN, amélioration de la survie dans le grp 4, versus grp 3 Non, pour <i>S. aureus</i>	L'administration des corticoïdes après les antibiotiques n'est pas plus efficace sur la survie que l'administration des antibiotiques seuls pour les BGN et n'est statistiquement pas différente de l'absence de traitement pour <i>S. aureus</i>	Faible mortalité liée à <i>S. aureus</i> pouvant partiellement expliquer l'absence de corticoïdes dans le grp



Source	Animaux (n)	Corticostéroïde(s) utilisé(s) et dose(s)/équivalence en HC	Modèle de choc	Moment d'administration du corticostéroïde(s)	Groupes	Objectif(s)	Amélioration de la survie p < 0,05 ?	Résultats secondaires	Biais/avantages
Li <i>et al.</i> 2007 [57]	Souris 637	HC IP 5, 25, 125 mg/kg/j pendant 2 j	ISB IT <i>E. coli</i> Forte, moyenne et faible dose	Soit immédiatement, soit 12 h après IT	Un grp contrôle (pas d'ATB ni HC) est réalisé pour chaque dose d'ISB. Pour chaque dose d'ISB: Grp 1: ISB + EV+ ATB + HC (5 mg/kg) Grp 2: ISB + EV+ ATB + HC (25 mg/kg) Grp 3: ISB + EV+ ATB + HC (125 mg/kg) Pour les mesures biologiques, chaque groupe reçoit soit ISB (forte dose) soit placebo: Grp1a: EV+ ATB + HC (125 mg/kg) Grp2a: EV+ ATB + placebo	Comparaison de la survie inter groupe à 168 h en fonction de la dose d'ISB et du moment d'initiation de l'HC Mesure à 24 et 48 h: de la NFS, des cytokines (IL 6, INF Y, TNF, MIP2, ...), nitrites/nitrites et réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire	Oui, 85 % de survie dans le grp 1 et 3/ISB moyenne dose <i>versus</i> 50 % dans le grp "contrôle" /ISB moyenne dose Globalement, la survie est améliorée par le HC (toutes doses d'ISB et HC confondues) avec un OR de 2,04 [1,37, 3,03]; p = 0,0004	Pas d'influence sur la survie du moment d'initiation de l'HC. Diminution significative du taux de lymphocyte, IL 6, INFY dans le grp 2a. Aucune influence de l'HC sur les paramètres du lavage broncho-alvéolaire	
Tran <i>et al.</i> 2004 [58]	Ratons nouveaux-nés 117	DEX IP 0,3 mg/kg/ 7,5 mg/kg	ISB SC <i>S. agalactiae</i>	Soit 24 h avant ISB, soit 30 min après ISB, soit 24 h après ISB	Grp 1: ISB + DEX aux différents temps Grp 2: ISB + placebo	Comparaison de la survie inter groupe à 5 j, de l'évolution de la bactériémie et de la prise de poids	Oui, 51 % de survie à 5 j dans le grp 1 uniquement si administration de DEX 24 h avant ISB, <i>versus</i> 31 % dans le grp 2	Diminution de la prise de poids dans le grp 1. Diminution de la bactériémie si DEX administrée 24 h avant et augmentation si administrée 30 min et 24 h après Amélioration de la fonction des neutrophiles dans le grp 1 quand DEX administrée 24 h avant	Aucune antibiothérapie
Mansart <i>et al.</i> 2003 [59]	Rats 30	DEX IP 1 mg/kg/ 25 mg/kg	LPC	22 h après LPC	Grp 1: LPC Grp 2: LPC + DEX Grp 3: LPC + L cannavamine Grp 4: LPC + DEX + L cannavamine	Comparaison de la survie inter groupe, des effets hémodynamiques, des concentrations en catécholamines, lactate, nitrite/nitrate	Oui, 60 % dans le grp 2 <i>versus</i> 20 % dans le grp 3 à 50 h <i>versus</i> 0 % grp 1 100 % de mortalité à 72 h dans tous les grps	Normalisation tensionnelle dans le grp 2 et 3, mais amélioration du débit cardiaque que dans le grp 2 Diminution plus forte du taux de nitrite/nitrate dans le grp 2 que 3 Diminution de la lactaémie et des catécholamines que dans le grp 2	
Angèle <i>et al.</i> 1998 [60]	Souris ≈ 45	DHEA SC 4 mg/kg	LPC 48 h après choc hémorragique et hémorragique contrôlé réanimé	Après réanimation du choc hémorragique et/ou à 24 et 48 h	Grp 1: Placebo puis LPC Grp 2: DHEA puis LPC Grp 3: DHEA à 0, 24, 48 h, puis LPC	Comparaison de la survie inter groupe à 10 j et de la restauration de la fonction macrocytaire et splénozytaire	Oui, 77 % dans le grp 3 <i>versus</i> 33 % dans le grp 2 <i>versus</i> 20 % dans le grp 1	Augmentation des splénozytes et de la synthèse par les macrophages d'IL1β, et 6 en période post traumatique et pré LPC dans les groupes "DHEA"	
Bouskela <i>et al.</i> 1994 [61]	Hamsters 42	DEX IV 10 mg/kg/ 250 mg/kg	LPS	90 min avant l'injection de LPS	Grp 1: LPS Grp 2: LPS + L NAG (inhibiteur de NOS) Grp 3: DEX puis LPS	Comparaison inter groupe de la survie, de l'hémodynamique, de la microcirculation <i>ex vivo</i> , de l'adhésion leucocytaire vasculaire	Oui, allongement de la survie à 92 ± 5 h dans le grp 2 <i>versus</i> 56 ± 7 h dans le grp 1 Réduction de la survie moyenne à 35 ± 6 h dans le grp 2	La DEX et la L NAG restaurent la pression artérielle sans effet sur la restauration du débit sanguin Seule la DEX maintient la vasoréactivité La L NAG ne prévient pas l'augmentation de la perméabilité vasculaire mais majorent l'adhésion leucocytaire	DEX administré en pré traitement

Source	Animaux (n)	Corticoid(e)s utilisé(s) et doses(s)/équivalence en HC	Modèle de choc	Moment d'administration du/des corticoïde(s)	Groupes	Objectif(s)	Amélioration de la survie p < 0,05 ?	Résultats secondaires	Biais/avantages
Coto <i>et al.</i> 1990 [62]	Rats 87	DEX IP 4 mg/kg/ 100 mg/kg	LPS <i>S. Enteritidis</i>	Juste après l'injection de LPS	Après 4 h de jeun Grp 1: LPS Grp 2: LPS + indométhacine Grp 3: LPS + DEX	Comparaison inter groupe de la survie à 24 et 48 h, de la glycémie et de lactatémie à 2, 4, 24 et 48 h	Oui, 85 % de survie à 48 h dans le grp 3 <i>versus</i> 10 % dans le grp 1 68 % de survie dans le grp 2	Lactatémie plus faible et glycémie plus élevée dans les grps traités à 4 h	
Bahrani <i>et al.</i> 1987 [63]	Rats 32	IV MET 30 mg/kg/ 150 mg/kg PRED 36 mg/kg/ 144 mg/kg DEX 6 mg/kg/ 150 mg/kg	LPS	1 h avant LPS puis juste après et toutes les 6 à 8 h pendant 24 h	Grp 1: LPS Grp 2: LPS + MET Grp 3: LPS+PRED Grp 4: LPS + DEX	Comparaison de la survie inter groupe à 48 h, du poids, de la glycémie, de la lactatémie, des leucocytes, des plaquettes, du fibrinogène, du complément, de la bilirubinémié	Oui, 100 % de survie à 48 h dans tous les grps traités <i>versus</i> 8 % dans le grp 1	Lactatémie plus faible, perte de poids, hyperglycémie à 24 h et augmentation des leucocytes dans les grps traités Pas de différence pour les autres paramètres	
Hinshaw <i>et al.</i> 1986 [64]	Chiens 29	MET IV 30 mg/kg/ 150 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	Avant l'ISB à différents temps (cf grps)	Grp 1: ISB Grp 2: MET J-2 et 2 doses à J-1 puis ISB + ATB Grp 3: de J-8 à J-1 inclus puis ISB + ATB Grp 4: MET de J-8 à J-1 inclus puis ISB + ATB + MET (bolus 15 mg/kg puis 30 mg/kg sur 5h30)	Comparaison de la survie inter groupe 7 j, des effets hémodynamiques, métaboliques et de la concentration de leucocytes sur 6 h post ISB	Oui, 42 % de survie à 7 j dans le grp 2 <i>versus</i> 33 % dans le grp 4 <i>versus</i> 0 % dans les grps 1 et 3	Chute de la pression artérielle plus marquée dans les grps 1 et 4 <i>versus</i> grps 2 et 3. Récession des leucocytes uniquement dans les grps 2 et 4 après ISB. Hyperlactatémie plus marquée dans le grp 4 <i>versus</i> grps 1 et 2. Hyperglycémie dans le grp 4 <i>versus</i> autres grps	Effets plutôt délétères sur la survie de la corticothérapie préalable
Hinshaw <i>et al.</i> 1985 [65]	Chiens 21	MET IV 60 mg/kg/ 300 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	Pendant l'ISB	Animaux tous surretalexomisés: Grp 1: contrôle Grp 2: ISB Grp 3: ISB + MET (IV sur 6 h) + ATB	Comparaison de la survie moyenne inter groupe, des effets hémodynamiques et biologiques	Oui, survie du grp 3 (112 ± 37 h) rejoint celle du grp 1 (126 ± 73 h)	Correction partielle du collapsus tensionnel dans le grp 3 Hyperlactatémie plus faible dans le grp 3 <i>versus</i> 2	
Ottosson <i>et al.</i> 1984 [66]	Rats 100	DEX IV 4 mg/kg/ 100 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	A l'apparition des signes de sepsis et 3 h après	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + ATB Grp 3: ISB + ATB + DEX Grp 4: ISB + ATB + RL Grp 5: ISB + ATB + alb Grp 6: ISB + ATB + D40 Grp 7: ISB + ATB + D70 Grp 8: ISB + ATB + HEA Grp 9: ISB + ATB + RL + DEX Grp 10: ISB + ATB + D40 + D70 + Alb + HEA + DEX	Comparaison de la survie inter groupe à 24 h et 7 j	Oui, 100 % de survie dans le grp 10 à 24 h et 7 j <i>versus</i> 50 % et 20 % de survie cumulée des grps 5, 6, 7, 8		Oui, 100 % de survie dans le grp 10 à 24 h et 7 j <i>versus</i> 50 % et 20 % de survie cumulée des grps 5, 6, 7, 8
Beller <i>et al.</i> 1983 [67]	Chiens 24	MET IV 60 mg/kg/ 300 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	Pendant l'ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + MET en continu + gentamycine Grp 3: ISB + MET en bolus 3 fois + gentamycine Grp 4: ISB + MET en continu + neilymycine	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j, des effets hémodynamiques, biologiques et de l'efficacité du MET en bolus <i>versus</i> continue sur 6 h post ISB	Oui, 100 % de survie à 7 j dans le grp 2 <i>versus</i> 83 % dans le grp 4, <i>versus</i> 57 % dans le grp 3	Pas de différence entre les grps traités pour les paramètres hémodynamiques, la lactatémie, les leucocytes, l'hémotase. Le pH du grp 2 est supérieur à 6 h <i>versus</i> le grp 3	Traitements débutés très précocement

Source	Animaux (n)	Corticostéroïde(s) utilisé(s) et dose(s)/équivalence en HC	Modèle de choc	Moment d'administration du/des corticostéroïde(s)	Groupes	Objectif(s)	Amélioration de la survie p < 0,05 ?	Résultats secondaires	Biais/avantages
Acher <i>et al.</i> 1983 [68]	Babouins 32	MET IV 75 mg/kg/ 375 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	Soit: pendant l'ISB, soit à 30 min, soit à 2 h, soit à 4 h, puis 3 fois sur 12 h	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + MET (à 30 min puis 3 fois sur 12 h) + ATB Grp 3: ISB + MET (à 2 h puis 3 fois sur 12 h) + ATB Grp 4: ISB + MET (à 4 h puis 3 fois sur 12 h) + ATB	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j Déterminer les organes protégés par les corticoïdes (autopsie et histologie)	Oui, 100 % de survie dans le grp 2 <i>versus</i> 85 % grp 3, <i>versus</i> 65 % grp 4	Non survivants : surrénales hémorragiques, nécrose hépatocellulaire, nécrose tubulaire aiguë, nécrose ou congestion des follicules spléniques, congestion intra-alvéolaire Survivants : lésions d'absentes à modérées	
Weissglas <i>et al.</i> 1982 [69]	Porcelets 24	MET IV 30 mg/kg/2 h/ 150 mg/kg/2 h	ISB IV <i>E. coli</i>	30 min après début de l'ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + naloxone Grp 3: ISB + MET Grp 4: ISB + MET + naloxone	Comparaison de la survie inter groupe, des effets hémodynamiques et biologiques	Non, pas de différence significative intergroupe	Amélioration du débit cardiaque et de la pression artérielle dans le grp 4 <i>versus</i> autres grps. Diminution du ration lactate/pyruvate dans le grp 4 <i>versus</i> autres grps	
Goulsrand <i>et al.</i> 1982 [70]	Rats 122	DEX IV 45 mg/kg/ 1125 mg/kg	ISB IV <i>S. Pneumoniae</i>	DEX + ATB soit 18 h et 42 h (précoce), soit 24 h et 48 h (tardif) après ISB	Grp 1: Sham + ISB Rats splénectomisés (chaque grp est divisé en 2 précoce et tardif) Grp 2: ISB + DEX Grp 3: ISB + ATB Grp 4: ISB + DEX + ATB	Comparaison de la survie inter groupe à 72 h en fonction des temps d'administration (précoce ou tardif) des traitements	Oui, 100 % de survie à 72 h dans le grp 4 (précoce et tardif) <i>versus</i> = 20 % (précoce et tardif) dans le grp 2 et 100 % (précoce) et 29 % (tardif) dans le grp 3		
Fabian <i>et al.</i> 1982 [71]	Rats 169	MET IM 45 mg/kg	LPC	4 h et 8 h après la LPC	Grp 1: LPC Grp 2: LPC + MET Grp 3: LPC + gentamicine (4 et 8 h après LPC) Grp 4: LPC + gentamicine (4 et 8 h après LPC) + MET Grp 5: LPC + gentamicine + clindamycine (4 et 8 h après LPC) Grp 6: LPC + gentamicine (4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h après LPC) Grp 7: LPC + gentamicine (4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h après LPC) + MET	Comparaison de la survie inter groupe à 24, 36, 48, 72 et $\geq$ 120 h	Oui, 76 % de survie à $\geq$ 120 h dans le grp 7 <i>versus</i> 38 % dans le grp 6 Aucun survivant dans le grp 2 à $\geq$ 120 h	Un traitement par gentamicine prolonge est significativement associé à une augmentation de la survie (38 % grp 6 <i>versus</i> 0 % grp 2 à $\geq$ 120 h)	
Hinshaw <i>et al.</i> 1981 [72]	Babouins 16	MET IV 75 mg/kg/ 375 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	4 h, 6 h, 9,5 h, 11 h après ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + ATB + MET	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j, des effets hémodynamiques et biologiques	Oui, 62,5 % de survie à 7 j dans le grp 2 <i>versus</i> 0 % dans le grp 1	Prévention de l'hypoglycémie, de l'hypoalbuminémie et de l'anurie dans le grp 2	
Hinshaw <i>et al.</i> 1981 [73]	Babouins 14	MET IV 75 mg/kg/ 375 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	2 h, 2 h 30, 6 h et 10 h après ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + ATB + MET	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j, des effets hémodynamiques et biologiques	Oui, 85 % de survie à 7 j dans le grp 2 (administration retardée des corticoïdes) <i>versus</i> 0 % dans le grp 1	Prévention de l'hypoglycémie, de l'hypoalbuminémie dans le grp 2	Tous les animaux ne sont pas en collapsus au moment de l'administration des corticoïdes

Source	Animaux (n)	Corticoïde(s) utilisé(s) et dose(s)/équivalence en HC	Modèle de choc	Moment d'administration du/des corticoïde(s)	Groupes	Objectif(s)	Amélioration de la survie p < 0,05 ?	Résultats secondaires	Biais/avantages
Hinslaw <i>et al.</i> 1980 [74]	Babouins 14	MET IV 75 mg/kg/ 375 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	30 min, 2h, 30, 6 h et 10 h après ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + ATB + MET Grp 3: ISB + ATB	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j, des effets hémodynamiques, biologiques et anatomo-pathologiques	Oui, 100 % de survie à 7 j dans le grp 2 <i>versus</i> 0 % dans les grps 1 et 3	Prévention de l'hypoglycémie, de l'hypo-insulinisme, de l'aururie, de l'atteinte surrénalienne dans le grp 2	Faible population, pas de choc au moment de l'administration des corticoïdes
Prageret <i>et al.</i> 1975 [75]	Chiens 22	MET IV 60 mg/kg/ 300 mg/kg	LPS	1 h et 7 h après LPS	Grp 1: LPS + ATB Grp 2: LPS + MET + ATB Grp 3: LPS + ECMO + MET + normothermie + ATB Grp 4: LPS + ECMO + MET + hypothermie + ATB	Comparaison de la survie inter groupe à 48 h et des effets hémodynamiques Examen autopsique et microscopique comparant les lésions d'organes	Oui, 66 % de survie à 48 h dans le grp 2 <i>versus</i> 33 % dans le grp 1, 0 % de survie dans les grps 3 et 4	Aucune différence inter groupe sur la pression artérielle, le débit cardiaque, les résistances artérielles Diminution du volume perfusé à 75 ml/kg/48 h dans le grp 2 <i>versus</i> 110 ml/kg/48 h dans le grp 1. Hémorragie et œdème intra-alvéolaire macro et microscopique sauf dans le grp 2. Infarctus mésentérique dans les grps 3 et 4	
White <i>et al.</i> 1978 [76]	Chiens 30	MET IV 30 mg/kg/ 150 mg/kg	LPS	15 min après LPS	Animaux vigiles: Grp 1: LPS en IVL Grp 2: LPS en IVL + MET Animaux anesthésiés: Grp 3: LPS en IVL après anesthésie Grp 4: LPS en IVD après anesthésie + MET Grp 5: LPS en IVD avant anesthésie	Comparaison de la survie inter groupe à 7 j	Oui, 83 % de survie à 7 j dans les grps 2 et 3	Pas d'influence de l'anesthésie mais de la modalité d'injection du LPS sur la survie: LPS IVD avec ou sans MET: 100 % mortalité <i>versus</i> LPS IVL + MET 83 % survie	
Pitecaum <i>et al.</i> 1975 [77]	Rats 250	DEX IV 10 mg/kg/ 250 mg/kg	ISB IV <i>E. coli</i>	Juste après ISB	Grp 1: ISB Grp 2: ISB + DEX Grp 3: ISB + ampicilline Grp 4: ISB + gentamycine Grp 5: ISB + chloramphénicol Grp 6: ISB + ampicilline + gentamycine Grp 7: ISB + ampicilline + DEX Grp 8: ISB + chloramphénicol + DEX Grp 9: ISB + gentamycine + DEX Grp 10: ISB + ampicilline + gentamycine + DEX Grp 11: ISB + ampicilline + chloramphénicol + DEX	Comparaison de la survie intergroupe à 8 h et à 20 h	Oui, 100 % de survie à 8 h et 86 % à 20 h dans le grp 10 <i>versus</i> 52 % et 39 % dans le grp 6 Survie augmentée dans tous les grps traités avec DEX	De plus fortes posologies d'ampicillines n'améliorent pas la survie, y compris en association avec la DEX	
Johnson G. <i>et al.</i> 1975 [78]	Babouins 24	MET IV 30 mg/kg/ 150 mg/kg	LPS	A l'apparition des symptômes de choc	Grp 1: LPS Grp 2: LPS + MET Grp 3: LPS + MET + ELEC Grp 4: LPS + ELEC	Comparaison de la survie inter groupe, des effets hémodynamiques et métaboliques	Non, pas d'amélioration de la survie dans les grps traités	Pas d'amélioration hémodynamique (pression et débit cardiaque), métabolique (lactates, 2-3 DPG)	Dose importante de LPS expliquant la mortalité
Clermont <i>et al.</i> 1974 [79]	Chiens 12	PRED IV 30 mg/kg/ 120 mg/kg	LPS	A l'apparition des symptômes de choc	Grp 1: LPS Grp 2: LPS + PRED	Comparaison de la survie inter groupe à 5 j, des effets hémodynamiques et métaboliques	Oui, 100 % de survie à 5 j dans le grp 2 <i>versus</i> 0 % dans le grp 1	Pas de différence sur la lactatémie, le pyruvate et le pH. Diminution des phosphatases acides dans le grp 2	Pas d'acidose retrouvée chez les animaux en choc

## Études chez l'homme

La corticothérapie au cours du choc septique chez l'homme est un traitement utilisé depuis plus de cinquante ans. Cette thérapeutique initialement administrée sous forme de bolus à forte dose, avec l'objectif de limiter le relargage cytokinique, ne permettait pas de gain de survie. Par la suite, des posologies de plus en plus faibles sur des périodes prolongées (< 300 mg/24 heures d'hydrocortisone pendant plus de cinq jours) ont été étudiées et tendent à retrouver une amélioration de la survie chez les patients en choc septique. Néanmoins, une étude multicentrique récente n'a pas mis en évidence de bénéfice sur la survie à 28 jours et en souligne les effets secondaires délétères (survenue d'un nouveau choc septique, hyperglycémie) [79]. Ainsi, les recommandations les plus récentes en limitent l'usage au choc septique ne répondant pas à l'expansion volémique et nécessitant des vasopresseurs [80].

La dernière méta-analyse sur le sujet ne retrouve pas d'amélioration globale de la survie à J28 [20]. Cependant, les auteurs soulignent l'hétérogénéité des doses et des durées de corticothérapie. Ainsi, l'analyse pré-établie en sous-groupes retrouve, pour des faibles doses (< 300 mg/24 heures) et des durées prolongées (> 5 jours), une amélioration significative de la survie à J28 et de la mortalité hospitalière (Fig. 3).

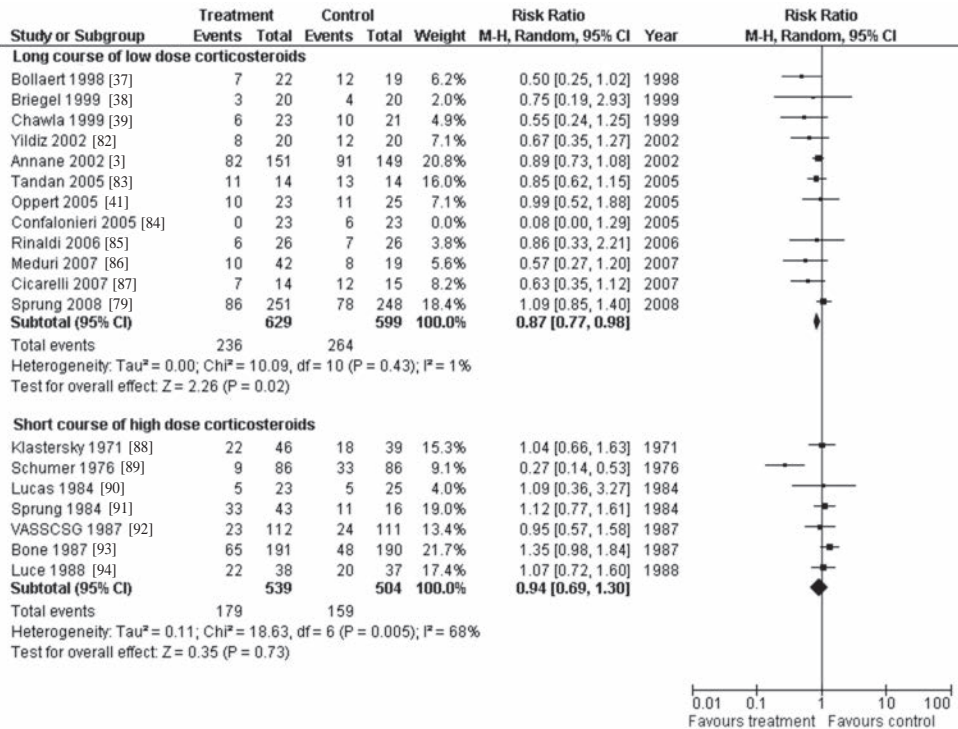


Fig. 3.- Mortalité à 28 jours par sous-groupes en fonction de la dose et de la durée d'administration des corticoïdes.

## Diagnostic de l'insuffisance surrénalienne aiguë relative dans le choc septique

Le diagnostic de l'ISA est habituellement basé sur la mesure de deux indices : le taux de cortisol basal et le delta de cortisol, une heure après l'administration de 250 µg de Synacthène® [94]. L'insuffisance surrénalienne absolue se définit par un cortisol basal inférieur à 15 µg/dl. Elle n'est retrouvée que chez 20 % des patients en choc septique. Un delta de cortisol inférieur à 9 µg/dl suffit à définir l'insuffisance surrénalienne relative quel que soit le taux basal initial et est retrouvée chez près de 50 % des patients en choc septique. Il faut cependant tenir compte des limitations inhérentes aux techniques de mesure. Le taux de cortisol varie en fonction du

nyctémère et, par conséquent, l'heure du dosage à l'entrée du patient en réanimation influe donc sur son résultat. La plupart des dosages sont des mesures du cortisol total sans distinction entre la forme liée et la forme libre (forme active). De même, la reproductibilité du test au Synacthène® chez un même malade est pauvre. Enfin, une très grande hétérogénéité existe entre les différents kits de dosage, pouvant expliquer les variations parfois importantes entre les différents laboratoires. Connaissant ces limites, ces tests n'en restent pas moins des indicateurs précieux. Trois groupes pronostiques sont ainsi individualisés en fonction du taux basal et de la réponse au test de stimulation à 1 heure (Tabl. IV) [95].

**Tableau IV**

*Pronostic en fonction de la cortisolémie basale et de la réponse au test au Synacthène®.*

	Bon pronostic	Pronostic intermédiaire	Mauvais pronostic
Cortisol basal (µg/dl)	< 34	> 34 ou/	> 34
Delta cortisol (µg/dl)	> 9	< 9	< 9
Pourcentage des patients en choc septique (%)	25	50	33
Mortalité à J28 (%)	26	67	82

## Modalités de prescription des corticoïdes durant le choc septique

Nous proposons deux modalités de prise en charge avec et sans réalisation du test au Synacthène® pour l'introduction de la corticothérapie dans le choc septique (Fig. 4).

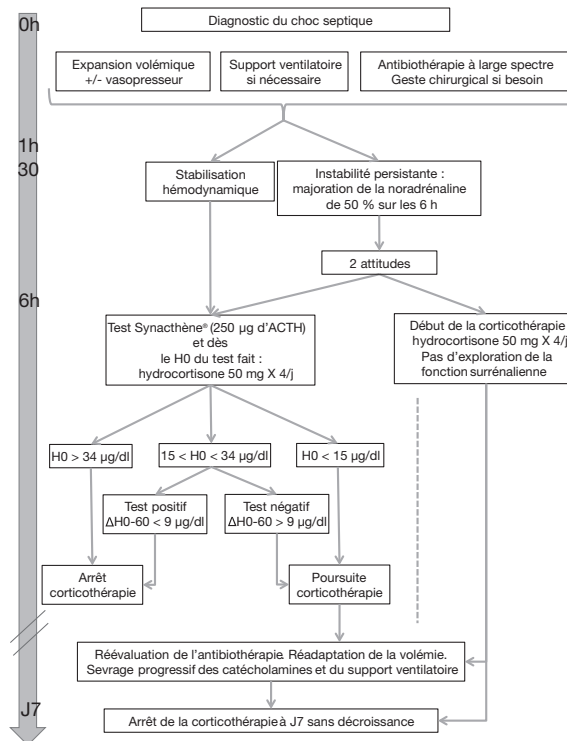


Fig. 4. - Proposition d'un arbre décisionnel d'administration des corticoïdes durant le choc septique avec et sans l'utilisation du test au Synacthène®.

## Conclusion

Les corticoïdes sont très probablement un traitement adjuvant essentiel du choc septique. Néanmoins, leur efficacité dépend de leurs modalités d'administration. A ce jour, seule une administration prolongée d'au moins sept jours d'hydrocortisone à faibles doses (< à 300 mg/24 heures) a fait la preuve de son efficacité. Le dépistage de l'insuffisance surrénalienne relative par le test au Synacthène® n'est plus systématique dans ce cadre mais garde une valeur informative non négligeable.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Group TES: EPISEPSIS** - A reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intens. Care Med.*, 2004 ; 30 : 580-588.
- [2] **Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R.** - Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit. Care Med.*, 2001 ; 29 : 1303-1310.
- [3] **Annane D., Sèbille V., Charpentier C., Bollaert P.E., François B., Korach J.M., Capellier G., Cohen Y., Azoulay E., Troché G. et al.** - Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*, 2002 ; 288(7) : 862-871.
- [4] **Croxtall J.D., Choudhury Q., Flower R.J.** - Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, 2000 ; 130 : 289-298.
- [5] **Lowenberg M., Tuynman J., Bilderbeek J., Gaber T., Buttgerit F., Van Deventer S., Peppelenbosch M., Hommes D.** - Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood*, 2005 ; 106 : 1703-1710.
- [6] **Bamberger C.M., Bamberger A.M., De Castro M., Chrousos G.P.** - Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.*, 1995 ; 95(6) : 2435-2441.
- [7] **Grad I., Picard D.** - The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007 ; 275 : 2-12.
- [8] **Tsai M.J., O'Malley B.W.** - Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.*, 1994 ; 63 : 451-486.
- [9] **Almawi W.Y., Melemedjian O.K.** - Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2002 ; 71 : 9-15.
- [10] **Wikstrom A.C.** - Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J. Endocrinol.*, 2003 ; 178 : 331-337.
- [11] **Perretti M., Flower R.J.** - Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J. Immunol.*, 1993 ; 150 : 992-999.
- [12] **Auphan N., DiDonato J.A., Rosette C., Helmberg A., Karin M.** - Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science*, 1995 ; 270 : 286-290.
- [13] **Scheinman R.I., Cogswell P.C., Lofquist A.K., Baldwin A.S.J.** - Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 1995 ; 270 : 283-286.
- [14] **Dostert A., Heinzel T.** - Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.*, 2004 ; 10 : 2807-2816.
- [15] **Heck S., Bender K., Kullmann M., Gottlicher M., Herrlich P., Cato A.C.** - I $\kappa$ B $\alpha$ -independent down-regulation of NF- $\kappa$ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 1997 ; 16 : 4698-4707.
- [16] **Mittelstadt P.R., Ashwell J.D.** - Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.*, 2001 ; 276 : 29603-29610.
- [17] **Buttgerit F., Saag K.G., Cutolo M., Da Silva J.A., Bijlsma J.W.** - The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 2005 ; 34(1) : 14-21.

- [18] **Buttgereit F., Scheffold A.** - Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 2002 ; 67(6) : 529-534.
- [19] **Bartholome B., Spies C.M., Gaber T., Schuchmann S., Berki T., Kunkel D., Bienert M., Radbruch A., Burmester G.R., Lauster R. et al.** - Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.*, 2004 ; 18(1) : 70-80.
- [20] **Annane D., Bellissant E., Bollaert P.E., Briegel J., Confalonieri M., De Gaudio R., Keh D., Kupfer Y., Oppert M., Meduri G.U.** - Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA*, 2009 ; 301(22) : 2362-2375.
- [21] **Vinclair M., Broux C., Faure P., Brun J., Genty C., Jacquot C., Chabre O., Payen J.F.** - Duration of adrenal inhibition following a single dose of etomidate in critically ill patients. *Intens. Care Med.*, 2008 ; 34(4) : 714-719.
- [22] **Deuschle M., Lecci O., Stalla G.K., Landgraf R., Hamann B., Lederbogen F., Uhr M., Luppa P., Maras A., Colla M. et al.** - Steroid synthesis inhibition with ketoconazole and its effect upon the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*, 2003 ; 28(2) : 379-383.
- [23] **Jaattela M., Ilvesmaki V., Voutilainen R., Stenman U.H., Saksela E.** - Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology*, 1991 ; 128(1) : 623-629.
- [24] **Jaattela M., Carpen O., Stenman U.H., Saksela E.** - Regulation of ACTH-induced steroidogenesis in human fetal adrenals by rTNF-alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1990 ; 68(2-3) : R31-R36.
- [25] **Natarajan R., Ploszaj S., Horton R., Nadler J.** - Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. *Endocrinology*, 1989 ; 125(6) : 3084-3089.
- [26] **Van Leeuwen H.J., Heezius E.C., Dallinga G.M., Van Strijp J.A., Verhoef J., Van Kessel K.P.** - Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.*, 2003 ; 31(5) : 1359-1366.
- [27] **Van der Voort P.H., Gerritsen R.T., Bakker A.J., Boerma E.C., Kuiper M.A., De Heide L.** - HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients. *Intens. Care Med.*, 2003 ; 29(12) : 2199-2203.
- [28] **Chien J.Y., Jerng J.S., Yu C.J., Yang P.C.** - Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit. Care Med.*, 2005 ; 33(8) : 1688-1693.
- [29] **Grunfeld J.P., Eloy L.** - Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Hypertension*, 1987 ; 10(6) : 608-618.
- [30] **Gardiner S.M., Kemp P.A., March J.E., Bennett T.** - Regional haemodynamic responses to infusion of lipopolysaccharide in conscious rats: effects of pre or post-treatment with glibenclamide. *Br. J. Pharmacol.*, 1999 ; 128(8) : 1772-1778.
- [31] **Levy B., Collin S., Sennoun N., Ducrocq N., Kimmoun A., Asfar P., Perez P., Meziani F.** - Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intens. Care Med.*, 36(12) : 2019-2029.
- [32] **Steiner A., Locher R., Sachinidis A., Vetter W.** - Cortisol-stimulated phosphoinositide metabolism in vascular smooth muscle cells: a role for glucocorticoids in blood pressure control? *J. Hypertens. (Suppl.)*, 1989 ; 7(6) : S140-S141.
- [33] **Williamson P.M., Kohlhagen J.L., Mangos G.J., Whitworth J.A., Kelly J.J.** - Acute effects of hydrocortisone on plasma nitrate/nitrite activity and forearm vasodilator responsiveness in normal human subjects. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2005 ; 32(3) : 162-166.
- [34] **Bhagat K., Collier J., Vallance P.** - Local venous responses to endotoxin in humans. *Circulation*, 1996 ; 94(3) : 490-497.
- [35] **Annane D., Bellissant E., Sebille V., Lesieur O., Mathieu B., Raphael J.C., Gajdos P.** - Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1998 ; 46(6) : 589-597.
- [36] **Bellissant E., Annane D.** - Effect of hydrocortisone on phenylephrine - mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000 ; 68(3) : 293-303.
- [37] **Bollaert P.E., Charpentier C., Levy B., Debouverie M., Audibert G., Larcan A.** - Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Crit. Care Med.*, 1998 ; 26(4) : 645-650.



- [38] Briegel J., Forst H., Haller M., Schelling G., Kilger E., Kuprat G., Hemmer B., Hummel T., Lenhart A., Heyduck M. *et al.* - Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Crit. Care Med.*, 1999 ; 27(4) : 723-732.
- [39] Chawla K., Kupfer Y., Tessler S. - Hydrocortisone reverses refractory septic shock [Abstract]. *Crit. Care Med.*, 1999 ; 27 : A33.
- [40] Keh D., Boehnke T., Weber-Cartens S., Schulz C., Ahlers O., Bercker S., Volk H.D., Doecke W.D., Falke K.J., Gerlach H. - Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003 ; 167(4) : 512-520.
- [41] Oppert M., Schindler R., Husung C., Offermann K., Graf K.J., Boenisch O., Barckow D., Frei U., Eckardt K.U. - Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Crit. Care Med.*, 2005 ; 33(11) : 2457-2464.
- [42] Mukaida N., Zachariae C.C., Gusella G.L., Matsushima K. - Dexamethasone inhibits the induction of monocyte chemoattractant-activating factor production by IL-1 or tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 1991 ; 146(4) : 1212-1215.
- [43] Calandra T., Bernhagen J., Metz C.N., Spiegel L.A., Bacher M., Donnelly T., Cerami A., Bucala R. - MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 1995 ; 377(6544) : 68-71.
- [44] Bailey J.M., Makheja A.N., Pash J., Verma M. - Corticosteroids suppress cyclo-oxygenase messenger RNA levels and prostanoid synthesis in cultured vascular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988 ; 157(3) : 1159-1163.
- [45] Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990 ; 87(24) : 10043-10047.
- [46] Barber A.E., Coyle S.M., Marano M.A., Fischer E., Calvano S.E., Fong Y., Moldawer L.L., Lowry S.F. - Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J. Immunol.*, 1993 ; 150(5) : 1999-2006.
- [47] Van der Poll T., Barber A.E., Coyle S.M., Lowry S.F. - Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia - a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996 ; 81(10) : 3604-3606.
- [48] Barber A.E., Coyle S.M., Fischer E., Smith C., Van der Poll T., Shires G.T., Lowry S.F. - Influence of hypercortisolemia on soluble tumor necrosis factor receptor II and interleukin 1 receptor antagonist responses to endotoxin in human beings. *Surgery*, 1995 ; 118(2) : 406-410 (discussion 410-401).
- [49] Briegel J., Kellermann W., Forst H., Haller M., Bittl M., Hoffmann G.E., Buchler M., Uhl W., Peter K. - Low-dose hydrocortisone infusion attenuates the systemic inflammatory response syndrome. The Phospholipase A2 Study Group. *Clin. Investig.*, 1994 ; 72(10) : 782-787.
- [50] Annane D., Sebille V., Bellissant E. - Effect of low doses of corticosteroids in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.*, 2006 ; 34(1) : 22-30.
- [51] Maxime V., Fitting C., Annane D., Cavillon J.M. - Corticoids normalize leukocyte production of macrophage migration inhibitory factor in septic shock. *J. Infect. Dis.*, 2005 ; 191(1) : 138-144.
- [52] Cassol O.J. Jr, Comim C.M., Petronilho F., Constantino L.S., Streck E.L., Quevedo J., Dal-Pizzol F. - Low dose dexamethasone reverses depressive-like parameters and memory impairment in rats submitted to sepsis. *Neurosci. Lett.*, 2010 ; 473(2) : 126-130.
- [53] Osuchowski M.F., Connett J., Welch K., Granger J., Remick D.G. - Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immuno-modulatory therapy in experimental sepsis. *Crit. Care Med.*, 2009 ; 37(5) : 1567-1573.
- [54] Krakauer T., Buckley M.J., Huzella L.M., Alves D.A. - Critical timing, location and duration of glucocorticoid administration rescue mice from superantigen-induced shock and attenuate lung injury. *Int. Immunopharmacol.*, 2009 ; 9(10) : 1168-1174.
- [55] Cetinkaya R.A., Gorenek L., Coskun O., Eyigun C.P., Senses Z., Ide T., Kilic S. - The effect of methylprednisolone on treatment in rats with induced sepsis. *Clin. Exp. Med.*, 2009 ; 9(1) : 45-50.
- [56] Fadel M.V., Repka J.C., Cunha C.L., Leao M.T. - Inadequate timing between corticosteroid and antibiotics applications increases mortality due to sepsis. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008 ; 12(5) : 416-422.

- [57] Li Y., Cui X., Li X., Solomon S.B., Danner R.L., Banks S.M., Fitz Y., Annane D., Natanson C., Eichacker P.Q. - Risk of death does not alter the efficacy of hydrocortisone therapy in a mouse *Escherichia coli* pneumonia model: risk and corticosteroids in sepsis. *Intens. Care Med.*, 2008 ; 34(3) : 568-577.
- [58] Tran T.V., Weisman L.E. - Dexamethasone effects on group B streptococcal infection in newborn rats. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2004 ; 23(1) : 47-52.
- [59] Mansart A., Bollaert P.E., Levy B., Nicolas M.B., Mallie J.P. - Comparative effects of dexamethasone and L-canavanine in experimental septic shock. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003 ; 475(1-3) : 61-67.
- [60] Angele M.K., Catania R.A., Ayala A., Cioffi W.G., Bland K.I., Chaudry I.H. - Dehydroepiandrosterone: an inexpensive steroid hormone that decreases the mortality due to sepsis following trauma-induced hemorrhage. *Arch. Surg.*, 1998 ; 133(12) : 1281-1288.
- [61] Bouskela E., Rubanyi G.M. - Effects of NW-nitro-L-arginine and dexamethasone on early events following lipopolysaccharide injection: observations in the hamster cheek pouch microcirculation. *Shock*, 1994 ; 1(5) : 347-353.
- [62] Goto M., Zeller W.P., Hurley R.M. - Dexamethasone and indomethacin treatment during endotoxemia in the suckling rat. *Circ. Shock*, 1990 ; 32(2) : 113-122.
- [63] Bahrami S., Schiesser A., Redl H., Schlag G. - Comparison of different corticosteroids in rat endotoxemia. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1987 ; 236B : 273-286.
- [64] Hinshaw L.B., Beller B.K., Chang A.C., Passey R.B., Lahti R.A., Flournoy D.J., Lane M.M., Archer L.T. - Effects of prior administration of steroids upon recovery from lethal sepsis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1986 ; 163(4) : 335-344.
- [65] Hinshaw L.B., Beller B.K., Chang A.C., Murray C.K., Flournoy D.J., Passey R.B., Archer L.T. - Corticosteroid/antibiotic treatment of adrenalectomized dogs challenged with lethal *Escherichia coli*. *Circ. Shock*, 1985 ; 16(3) : 265-277.
- [66] Ottosson J., Dawidson I., Brandberg A., Eriksson B. - Experimental septic shock: relative effects of treatment with antibiotics, crystalloid or colloid solution infusions and corticosteroids. *Crit. Care Med.*, 1984 ; 12(7) : 560-564.
- [67] Beller B.K., Archer L.T., Passey R.B., Flournoy D.J., Hinshaw L.B. - Effectiveness of modified steroid-antibiotic therapies for lethal sepsis in the dog. *Arch. Surg.*, 1983 ; 118(11) : 1293-1299.
- [68] Archer L.T., Kosanke S.D., Beller B.K., Passey R.B., Hinshaw L.B. - Prevention or amelioration of morphologic lesions in LD100 *Escherichia coli*-shocked baboons with steroid/antibiotic therapy. *Adv. Shock Res.*, 1983 ; 10 : 195-215.
- [69] Weissglas I.S., Hinchey E.J., Chiu R.C. - Naloxone and methylprednisolone in the treatment of experimental septic shock. *J. Surg. Res.*, 1982 ; 33(2) : 131-135.
- [70] Gullstrand P., Alwmark A., Schalen C. - Effect of steroids on the outcome of penicillin treatment in pneumococcal sepsis in splenectomized rats. *Surgery*, 1982 ; 91(2) : 222-225.
- [71] Fabian T.C., Patterson R. - Steroid therapy in septic shock. Survival studies in a laboratory model. *Am. Surg.*, 1982 ; 48(12) : 614-617.
- [72] Hinshaw L.B., Beller-Todd B.K., Archer L.T., Benjamin B., Flournoy D.J., Passey R., Wilson M.F. - Effectiveness of steroid/antibiotic treatment in primates administered LD100 *Escherichia coli*. *Ann. Surg.*, 1981 ; 194(1) : 51-56.
- [73] Hinshaw L.B., Archer L.T., Beller-Todd B.K., Coalson J.J., Flournoy D.J., Passey R., Benjamin B., White G.L. - Survival of primates in LD100 septic shock following steroid/antibiotic therapy. *J. Surg. Res.*, 1980 ; 28(2) : 151-170.
- [74] Prager R., Kirsh M.M., Dunn E., Nishiyama R., Straker J., Lee R., Sloan H. - The benefits of corticosteroids in endotoxic shock. *Ann. Thorac. Surg.*, 1975 ; 19(2) : 142-152.
- [75] White G.L., Archer L.T., Beller B.K., Hinshaw L.B. - Increased survival with methylprednisolone treatment in canine endotoxin shock. *J. Surg. Res.*, 1978 ; 25(4) : 357-364.
- [76] Pitcairn M., Schuler J., Erve P.R., Holtzman S., Schumer W. - Glucocorticoid and antibiotic effect on experimental gram-negative bacteremic shock. *Arch. Surg.*, 1975 ; 110(8) : 1012-1015.
- [77] Johnson G. Jr, McDevitt N.B., Proctor H.J. - Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in endotoxic shock in the subhuman primate: response to fluid and/or methylprednisolone succinate. *Ann. Surg.*, 1974 ; 180(5) : 783-786.

- [78] **Clermont H.G., Williams J.S., Adams J.T.** - Steroid effect on the release of the lysosomal enzyme acid phosphatase in shock. *Ann. Surg.*, 1974 ; 179(6) : 917-921.
- [79] **Sprung C.L., Annane D., Keh D., Moreno R., Singer M., Freivogel K., Weiss Y.G., Benbenishty J., Kalenka A., Forst H. et al.** - Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 2008 ; 358(2) : 111-124.
- [80] **Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M., Bion J., Parker M.M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D.C., Brun-Buisson C., Beale R. et al.** - Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2008. *Crit. Care Med.*, 2008 ; 36(1) : 296-327.
- [81] **Yildiz O., Doganay M., Aygen B., Guven M., Kelestimur F., Tutuu A.** - Physiological-dose steroid therapy in sepsis [ISRCTN36253388]. *Crit. Care.*, 2002 ; 6(3) : 251-259.
- [82] **Tandan S.M., Guleria R., Gupta N.** - Low dose steroids and adrenocortical insufficiency in septic shock: a double-blind randomized controlled trial from India. In: *Proceedings of the American Thoracic Society Meeting New York*. American Thoracic Society, 2005 : A24.
- [83] **Confalonieri M., Urbino R., Potena A., Piattella M., Parigi P., Puccio G., Della Porta R., Giorgio C., Blasi F., Umberger R. et al.** - Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005 ; 171(3) : 242-248.
- [84] **Rinaldi S., Adem Bri C., Grechi S., De Gaudio A.R.** - Low-dose hydrocortisone during severe sepsis: effects on microalbuminuria. *Crit. Care Med.*, 2006 ; 34(9) : 2334-2339.
- [85] **Cicarelli D.D., Vieira J.E., Bensenor F.E.** - Early dexamethasone treatment for septic shock patients: a prospective randomized clinical trial. *Sao Paulo Med. J.*, 2007 ; 125(4) : 237-241.
- [86] **Meduri G.U., Golden E., Freire A.X., Taylor E., Zaman M., Carson S.J., Gibson M., Umberger R.** - Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. *Chest*, 2007 ; 131(4) : 954-963.
- [87] **Klasterksy J., Cappel R., Debusscher L.** - Effectiveness of betamethasone in management of severe infections. A double-blind study. *N. Engl. J. Med.*, 1971 ; 284(22) : 1248-1250.
- [88] **Schumer W.** - Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Ann. Surg.*, 1976 ; 184(3) : 333-341.
- [89] **Lucas C.E., Ledgerwood A.M.** - The cardiopulmonary response to massive doses of steroids in patients with septic shock. *Arch. Surg.*, 1984 ; 119(5) : 537-541.
- [90] **Sprung C.L., Caralis P.V., Marcial E.H., Pierce M., Gelbard M.A., Long W.M., Duncan R.C., Tendler M.D., Karpf M.** - The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N. Engl. J. Med.*, 1984 ; 311(18) : 1137-1143.
- [91] **The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group** - Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis. *N. Engl. J. Med.*, 1987 ; 317(11) : 659-665.
- [92] **Bone R.C., Fisher C.J. Jr, Clemmer T.P., Slotman G.J., Metz C.A., Balk R.A.** - A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 1987 ; 317(11) : 653-658.
- [93] **Luce J.M., Montgomery A.B., Marks J.D., Turner J., Metz C.A., Murray J.F.** - Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988 ; 138(1) : 62-68.
- [94] **Cooper M.S., Stewart P.M.** - Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N. Engl. J. Med.*, 2003 ; 348(8) : 727-734.
- [95] **Annane D., Sebille V., Troche G., Raphael J.C., Gajdos P., Bellissant E.** - A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA*, 2000 ; 283(8) : 1038-1045.



## **Annexe 2 : Cardiac Contractile Reserve Parameters Are Related to Prognosis in Septic Shock**

## Clinical Study

# Cardiac Contractile Reserve Parameters Are Related to Prognosis in Septic Shock

Antoine Kimmoun,<sup>1</sup> Nicolas Ducrocq,<sup>1</sup> Sébastien Mory,<sup>1</sup> Remi Delfosse,<sup>1</sup>  
Laura Muller,<sup>1</sup> Pierre Perez,<sup>1</sup> Renaud Fay,<sup>2,3</sup> and Bruno Levy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Service de Réanimation Médicale Brabois, CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France

<sup>2</sup> INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-9501 and CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France

<sup>3</sup> Université de Lorraine, Nancy, France

Correspondence should be addressed to Antoine Kimmoun; [akimmoun@gmail.com](mailto:akimmoun@gmail.com)

Received 7 April 2013; Revised 10 June 2013; Accepted 24 June 2013

Academic Editor: Boris Jung

Copyright © 2013 Antoine Kimmoun et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Introduction.** Cardiac reserve could be defined as the spontaneous magnitude from basal to maximal cardiac power under stress conditions. The aim of this study was to evaluate the prognostic value of cardiac reserve parameters in resuscitated septic shock patients. **Methods.** Seventy patients with septic shock were included in a prospective and observational study. Prior to inclusion, patients were resuscitated to reach a mean arterial pressure of 65–75 mmHg with an euvolemic status. General, hemodynamic, and cardiac reserve-related parameters (cardiac index, double product, and cardiac power index) were collected at inclusion and at day 1. **Results.** Seventy patients were included with 28-day mortality at 38.5%. Ten of the 70 patients died during the first day. In multivariate analysis, independent predictors of death were SAPS II  $\geq 58$  (OR: 3.36 [1.11–10.17];  $P = 0.032$ ), a high double product at inclusion (OR [95% IC]: 1.20 [1.00–1.45] per  $10^3$  mmHg-min;  $P = 0.047$ ), and at day 1, a decrease in cardiac index (1.30 [1.08–1.56] per  $0.5$  L/min/m<sup>2</sup>;  $P = 0.007$ ) or cardiac power index (1.84 [1.18–2.87] per  $0.1$  W/m<sup>2</sup>;  $P = 0.008$ ). **Conclusion.** In the first 24 hours, parameters related to cardiac reserve, such as double product and cardiac index evolution, provide crucial and easy to achieve hemodynamic physiological information, which may impact the outcome.

## 1. Introduction

Myocardial dysfunction is a frequent (30%–70%) complication during septic shock characterized by a biventricular systolic and diastolic dysfunction [1]. Usually, in septic shock patients, meeting the increased metabolic demand requires a rise in oxygen transport. In fluid-resuscitated septic shock patients, cardiac output is generally elevated due to decreased systemic vascular resistances but may be insufficient to meet the increased oxygen demand and could therefore impact outcome. However, it is very difficult to establish whether septic cardiomyopathy independently affects the prognosis of patients with septic shock. Vieillard-Baron et al. found that prognosis is poor in the presence of a hyperkinetic state, which reflects persistent and profound vasoplegia [2]. The severe reduction of afterload observed in septic shock may often mask cardiac impairment, enabling a severely

diseased heart to pump a seemingly “normal” cardiac output. Nevertheless, in the case of a severely depressed systemic vascular resistance of 200–300 dynes, cardiac output should be as high as 15–20 L/min to maintain arterial blood pressure [3]. Cardiac contractile reserve (CCR) is one means to assess the efficiency of cardiac adaptation to septic shock. In physiology, CCR could be defined as the spontaneous magnitude from basal to maximal cardiac power output and/or its responsiveness under stress test [4]. The work performed at each cardiac cycle to eject blood defines the stroke work. The product of stroke volume and mean arterial pressure allows an estimation of stroke work. By extension, cardiac power output used to assess CCR is defined by the product of stroke work and heart rate [5]. In critically ill patients, many CCR-related parameters (oxygen consumption, stroke work, cardiac power . . .) have been studied, most of which are derived from cardiac index (CI) magnitude during a dobutamine test

[6]. Double product (systolic arterial pressure  $\times$  heart rate) is an old hemodynamic tool, closely related to CR and known to have low values in chronic heart failure [7–9]. Its evolutive pattern has never been established during shock states.

Until now, no study has assessed the evolution of CCR-related parameters without the use of a pharmacological stress test in order to predict outcome in the setting of current guidelines [10]. We hypothesized that (i) septic shock itself is a sufficient stress condition to test CCR during septic shock and (ii) both the importance of vasoplegia and cardiac adaptation are prognosis factors of septic shock evolution. Hence, the present report is a prospective study aimed at evaluating the predictive value of CCR parameters on mortality rate in septic shock patients treated according to Surviving Sepsis Campaign recommendations.

## 2. Methods

**2.1. Patients.** The study was conducted in a 13-bed medical Intensive Care Unit of a University Hospital. Patients were included in the first twelve hours after the diagnosis of septic shock defined by a systolic arterial pressure (SAP)  $<90$  mmHg (or a decrease  $>50$  mmHg in patients known to be hypertensive), and persisting mean arterial pressure (MAP)  $<70$  mmHg or diastolic arterial pressure (DAP)  $\leq 40$  mmHg despite adequate fluid resuscitation requiring vasoactive support by norepinephrine ( $>0.05$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) during more than one hour. Resuscitation followed the Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of septic shock patients. Norepinephrine was initiated at  $0.2$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , and infusion rate was rapidly increased and adjusted to maintain an MAP of 65–75 mmHg. Optimization of volemia before inclusion and throughout the entire inclusion period was confirmed by the following fluid responsiveness-prediction tests: delta pulse pressure (PP)  $<12\%$ , increase in cardiac index (CI)  $<10\%$  during a passive leg raising test and/or increase  $<5\%$  in PP during the end-expiratory occlusion test. Strategy included at least two fluid responsiveness-prediction tests performed every three hours or when deemed necessary according to the physician in charge. Any discordance between these two tests was followed by a 500 mL fluid challenge. An echocardiography was also performed to assess left ventricular fraction and respiratory variation of the inferior vena cava ( $(\text{diameter max} - \text{diameter min})/((\text{diameter max} + \text{diameter min})/2)$  which must be  $<12\%$  before inclusion. Particular attention was given to the normalization of the initial  $\text{ScVO}_2$  and lactatemia. When CI was  $<2.5$   $\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$  or/and  $\text{ScVO}_2$   $<70\%$  despite optimization of volemia at an MAP maintained between 65–75 mmHg, dobutamine was initiated at  $5$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  and then adapted to CI and  $\text{ScVO}_2$ . Antibiotics were also administered as soon as possible and adapted to the putative infection site. Hydrocortisone ( $50$   $\text{mg} \times 4/\text{day}$ ) was considered when patients remained vasopressor-dependent after at least six hours of norepinephrine therapy. This observational study was approved by our local and institutional Ethics Committees (Comité de Réflexion Ethique Nancéien Hospitalo-Universitaire). This observational and noninterventional study did not require any consent. An information letter was

delivered to each patient (or patient's representative) included in this study.

**2.2. Measurements.** Patients were monitored using a PiCCO 2 device (Pulsion Medical Systems, Munich, Germany) connected to a central venous jugular catheter and a thermistor-tipped arterial catheter in the femoral artery (PV2015L20N, Pulsion Medical Systems, Munich, Germany). The arterial catheter was connected to a specific PV8215 pressure sensor using a PV8215 monitoring kit (Pulsion Medical Systems, Munich, Germany). The average of three thermodilutions was systematically achieved during a hemodynamically stable period to obtain CCR-related parameters derived from the PiCCO device: CI, cardiac power index ( $\text{CPI} = \text{CI} \times \text{MAP}/451$ ), double product ( $\text{DP} = \text{SAP} \times \text{Heart Rate} [\text{HR}]$ ), left ejection fraction (LEF), global end diastolic volume (GEDV). Pulse contour derived cardiac output was continuously recorded on the PiCCO 2 device. Indexed systemic vascular resistance (ISVR) was calculated from MAP, CI, and measurement of central venous pressure (CVP) by a standard pressure transducer connected to the central venous jugular catheter ( $\text{ISVR} = [\text{MAP} - \text{CVP}]/\text{CI} \times 80$ ).

Biological analyses were performed in parallel: blood gases, central venous oxygen saturation ( $\text{ScVO}_2$ ), creatinine, hemoglobin, platelets, leukocytes, prothrombin, B-type natriuretic peptide, troponin T, and procalcitonin.

**2.3. Study Design.** After patient optimization defining “day 0,” a first set of hemodynamic measurements and biological analyses were performed. Twenty-four hours after inclusion defining “day 1,” the same above hemodynamic and biological data were collected. Duration of catecholamine infusion, length of hospital stay, and mortality at 28 days were also recorded.

## 3. Statistical Methods

All analyses were performed using SAS software R9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The two-tailed significance level was set at  $P < 0.05$ . Continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $m \pm \text{SD}$ ) and categorical variables as frequency (percent). Univariate comparisons were carried out using the Mann-Whitney or Chi-square test, as appropriate. Association of baseline characteristics (70 patients) and 1-day change from baseline (60 patients) with mortality were assessed in three separate models using multivariate logistic regression: baseline factors were tested in 2 models with and without SAPS II since this latter composite score will expectedly be strongly associated with prognosis and could mask other important factors; change at day 1 was analyzed in a 3rd model in 24 h survivors. All factors listed in Table 2 were tested in these three separate models. The final models retained only significant factors. Linearity of the association between factors and mortality (relationship between the independent and dependent variables which must be linear) was assessed by plotting the regression coefficients against the midpoints of tertiles of distribution. SAPS II, whose effect cannot be considered as linear, was dichotomized

TABLE 1: Comparison of preexisting conditions, bacterial source, site of infection, and ICU evolution.

	28-day survival (N = 43) m ± SD or n (%)	28-day death (N = 27) m ± SD or n (%)	P
Age (years)	63 ± 17	62 ± 14	NS
Male gender	31 (72%)	19 (70%)	NS
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26.3 ± 7.0	27.2 ± 6.8	NS
Duration of hospitalization in ICU (days)	14.0 ± 12.4	9.8 ± 10.1	—
Preexisting conditions			
Diabetes	18 (42%)	3 (11%)	0.007
Denutrition	5 (12%)	4 (15%)	NS
Hypertension	24 (56%)	15 (56%)	NS
Ischemic heart disease	10 (23%)	4 (15%)	NS
Congestive heart failure	6 (14%)	3 (11%)	NS
Chronic renal failure	4 (9%)	4 (15%)	NS
Chronic respiratory disease	11 (26%)	6 (22%)	NS
Homeopathy and cancer	5 (12%)	7 (26%)	NS
Immunosuppression	10 (23%)	11 (41%)	NS
Bacterial source			
Gram-negative	7 (16%)	10 (37%)	0.030
Gram-positive	17 (40%)	8 (30%)	
Other*	3 (7%)	5 (19%)	
No pathogen	17 (40%)	4 (15%)	
Site of infection			
Lung	25 (36%)	18 (26%)	NS
Catheter	1 (1%)	3 (4%)	
Endocardium	4 (6%)	0	
Abdomen	6 (9%)	1 (1%)	
Soft tissues	1 (1%)	3 (4%)	
Kidney	5 (7%)	2 (3%)	

\*Other: 2 *Pneumocystis Jirovecii*, 1 *Geotrichum* spp. ICU: intensive care unit.

according to the median (SAPS II  $\geq 58$ ) as the best balance between sensitivity and specificity using ROC curves. Other validity assumptions of the models (absence of interaction and collinearity, goodness-of-fit) were thoroughly verified. Odds ratios and event rates are illustrated, respectively, by forest plots and Kaplan-Meier curves. Thresholds for Kaplan-Meier plots were identified using ROC curves as above.

## 4. Results

**4.1. Population Characteristics.** Seventy consecutive patients with septic shock were included (19 women, 51 men, mean age  $62 \pm 16$  years) among whom 43 (61.4%) were alive at 28 days. Ten patients died before 24 hours. Patient characteristics (medical history, bacterial source, site of infection) are summarized in Table 1.

**4.2. Day 0 Characteristics (Table 2).** In univariate analysis, nonsurvivors had a significantly higher CI, HR, DP, and SAPS II (CI:  $3.91 \pm 1.35$  versus  $3.28 \pm 1.18$  L/min/m<sup>2</sup>;  $P = 0.036$ , HR:  $115 \pm 26$  versus  $97 \pm 23$  bpm;  $P = 0.07$ , DP:  $13310 \pm 3385$  versus  $10990 \pm 2847$  mmHg·bpm (Figure 1);  $P = 0.006$  and SAPS II:  $53 \pm 16$  versus  $69 \pm 22$ ;  $P = 0.005$ ).

In multivariate analysis, a high DP (OR 1.20 [1.00–1.45] per  $10^3$  mmHg·bpm;  $P = 0.047$ ) and SAPS II  $\geq 58$  (OR: 3.36 [1.11–10.17];  $P = 0.032$ ) were the only two factors associated with 28-day mortality (Figure 2).

Biological parameters were also associated with mortality at 28 days in univariate analysis (online appendix; see Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2013/930673>): nonsurvivors had lower pH ( $7.27 \pm 0.14$  versus  $7.34 \pm 0.09$ ;  $P = 0.022$ ), lower hemoglobin levels ( $9.2 \pm 1.7$  versus  $10.5 \pm 1.8$  g/dL;  $P = 0.005$ ), and lower platelet levels ( $152 \pm 158$  versus  $241 \pm 170$  G/l;  $P = 0.01$ ).

**4.3. Twenty-Four Hour Change from Day 0 (Table 2).** At day 1, except for platelet levels (nonsurvivors:  $132 \pm 108$  G/l versus survivors:  $211 \pm 123$  G/l;  $P = 0.04$ ), no differences in hemodynamic or biological data were found between 28-day survivors and nonsurvivors (Table 2).

In univariate analysis, a decrease in CCR-related parameters was associated with 28-day mortality (CI:  $-0.55 \pm 0.73$  versus  $+0.18 \pm 0.86$  L/min/m<sup>2</sup>;  $P = 0.004$ ; (Figure 3), CPI:  $-0.08 \pm 0.12$  versus  $+0.06 \pm 0.16$  W/m<sup>2</sup>;  $P = 0.005$ , DP:  $-2361 \pm 3422$  versus  $-22 \pm 3446$  mmHg·bpm;  $P = 0.029$ ).



TABLE 2: Hemodynamic characteristics at day 0 and day 1 in survivors and non-survivors.

	28-day survival		28-day death		P*	
	n	Day 0	n	Day 0	Day 0	Day 1
Volume expansion before inclusion (mL)	43	2326 ± 1843	27	2319 ± 1319	0.64	
Systolic blood pressure (mmHg)	43	114 ± 16	27	119 ± 14	0.24	0.083
Diastolic blood pressure (mmHg)	43	51 ± 9	27	51 ± 8	0.63	0.41
Mean arterial pressure (mmHg)	43	71 ± 9	27	69 ± 5	0.48	0.20
Heart rate (bpm)	43	97 ± 23	25	115 ± 26	0.007	0.97
Stroke Volume (mL)	43	34.6 ± 12.3	27	35.3 ± 11.7	0.50	0.34
Cardiac index (L/min/m <sup>2</sup> )	43	3.28 ± 1.18	27	3.91 ± 1.35	0.036	0.18
Systemic vascular resistance index (dyn·s/cm <sup>5</sup> ·m <sup>2</sup> )	41	1660 ± 684	24	1435 ± 517	0.26	0.89
Global ejection fraction (%)	38	20 ± 7	40	18 ± 7	0.33	0.094
Left ventricle ejection fraction (%)	43	51 ± 12	27	55 ± 8	0.41	
Central venous oxygen saturation (ScvO <sub>2</sub> , %)	35	73 ± 11	20	75 ± 11	0.21	0.20
Central Venous Pressure (mmHg)	41	10 ± 5	24	9 ± 5	0.09	0.80
Global end diastolic volume (mL/m <sup>2</sup> )	42	785 ± 261	42	835 ± 266	0.37	0.76
Double Product (mmHg·bpm)	42	10990 ± 2847	27	13310 ± 3385	0.006	0.39
Cardiac power index (W/m <sup>2</sup> )	43	0.52 ± 0.21	27	0.61 ± 0.22	0.058	0.063
SOFA score	43	12 ± 3	27	12 ± 3	0.26	
SAPS II score	43	53 ± 16	27	69 ± 22	0.005	
Norepinephrine (µg/kg/min)	43	0.63 ± 0.52	27	0.95 ± 1.04	0.33	0.13
Dobutamine (µg/kg/min)			12	9.4 ± 5.8		0.81
Duration of catecholamine administration (days)	43	5.2 ± 3.4	27	6.2 ± 7.5		
Lactatemia (mmol·L <sup>-1</sup> )	43	3.1 ± 3.0	27	3.2 ± 2.6	0.57	0.77

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SAPS II: Simplified Acute Physiology Score. \* P values from comparisons between survivors and non-survivors at day 0 and day 1 using the Mann-Whitney test.

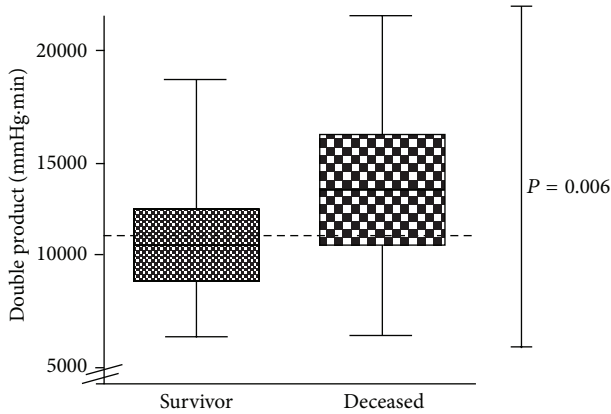


FIGURE 1: Double Product at day 0 in survivors and nonsurvivors. Dashed line: cut-off at 11000 mmHg/s.

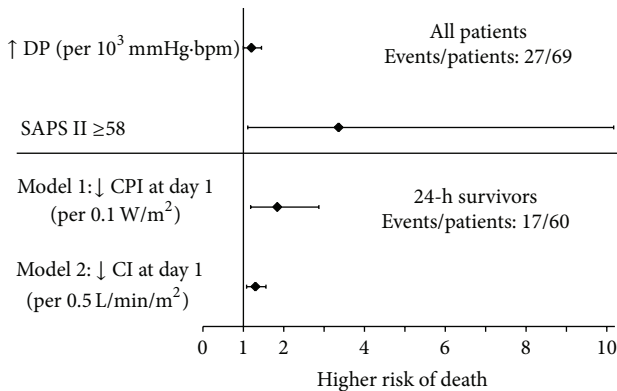


FIGURE 2: Multivariate analysis for Double Product (DP), SAPS II, Cardiac Index (CI) and Cardiac Power Index (CPI). bpm, beats per minute; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score.

In multivariate analysis (Figure 2), 28-day mortality was independently associated with a decrease in CPI (OR 1.84 [1.18–2.87] per 0.1 W/m<sup>2</sup>;  $P = 0.008$ ) and CI (OR 1.30 [1.08–1.56] per 0.5 L/min/m<sup>2</sup>;  $P = 0.007$ ).

**4.4. Survival Curves (Figure 4).** Figure 4 shows Kaplan Meier curves for all predicting significant factors from multivariate analyses: baseline DP >11000 mmHg·min and SAPS II >58; day-1 CI and CPI unchanged or decreased.

**5. Discussion**

The key finding of the present study is that in septic shock patients, without using any stress test, an early measurement (within the first 24 hours) of static and dynamic CCR parameters such as DP, CI, and CPI is independently associated with prognosis.

**5.1. Cardiac Contractile Reserve and Prognosis.** The prognostic role of CCR parameters has been evaluated in different populations of critically ill patients. Tan and Littler estimated CCR in 28 cardiogenic shock patients by the response of the

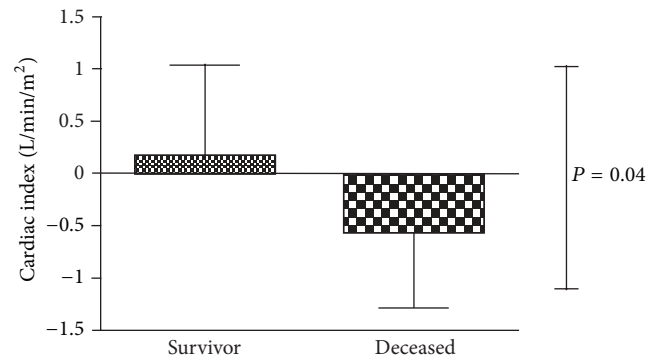


FIGURE 3: Cardiac index change from day 1 to day 0 in survivors and nonsurvivors. Cut-off at 0 L/min/m<sup>2</sup>.

failing heart to incremental doses of dobutamine. A resting CI <1.3 L/min/m<sup>2</sup>, a cardiac power output ≤0.35 W, and a peak cardiac power output in response to dobutamine stress <1 W were clearly associated with poor outcome [11]. Data from the SHOCK trial registry demonstrated that, at inclusion, a low cardiac power output <0.53 W accurately predicted in-hospital mortality [5]. As expected, the mean value of CPI was extremely low at inclusion in cardiogenic shock (0.22 ± 0.08 W/m<sup>2</sup> versus 0.62 ± 0.08 W/m<sup>2</sup> in healthy subjects) while elevated in initial septic shock (0.8 ± 0.13 W/m<sup>2</sup>) [12, 13].

In severe sepsis and septic shock, the prognostic value of a positive response to dobutamine challenge has already been demonstrated in several studies using different indices, including oxygen delivery/oxygen consumption relationship and increase in cardiac and stroke volume indices [6, 14–17].

**5.2. Initial and Spontaneous Evolution of CCR Parameters Is Related to Prognosis.** In the present study, both endogenous and exogenous catecholamine stimulations were used to test CCR parameters without performing any superimposed pharmacological test. We found that, at inclusion, an elevated DP was significantly associated with death. Considering that SAP was not different between survivors and nonsurvivors, it could be hypothesized that deceased patients increased their HR in an attempt to compensate for a decreased stroke volume due to septic cardiomyopathy. However, HR could also have been increased as a result of other factors such as hemoglobin level (which was slightly different between survivors and nonsurvivors), acidosis, PaO<sub>2</sub>, and volemia. After twenty-four hours, we found that the decrease in CI and CPI predicted a higher mortality. Vieillard-Baron et al. also reported a decreased cardiac contractility after 48 hours of evolution in 34% of septic shock patients. Of note, cardiac index was also found to be decreased in nonsurvivors between admission and day one [2]. Indeed, these parameters are dependent on MAP, HR, and stroke volume, that is, to preload, afterload, and inotropism. In the present study, patients were resuscitated such as to obtain a relatively fixed MAP (65–75 mmHg). Therefore, all arterial pressure components (SAP, DAP, MAP, ISVR) were similar for survivors and nonsurvivors. Dobutamine was infused at very low doses; its administration was not different between survivors and

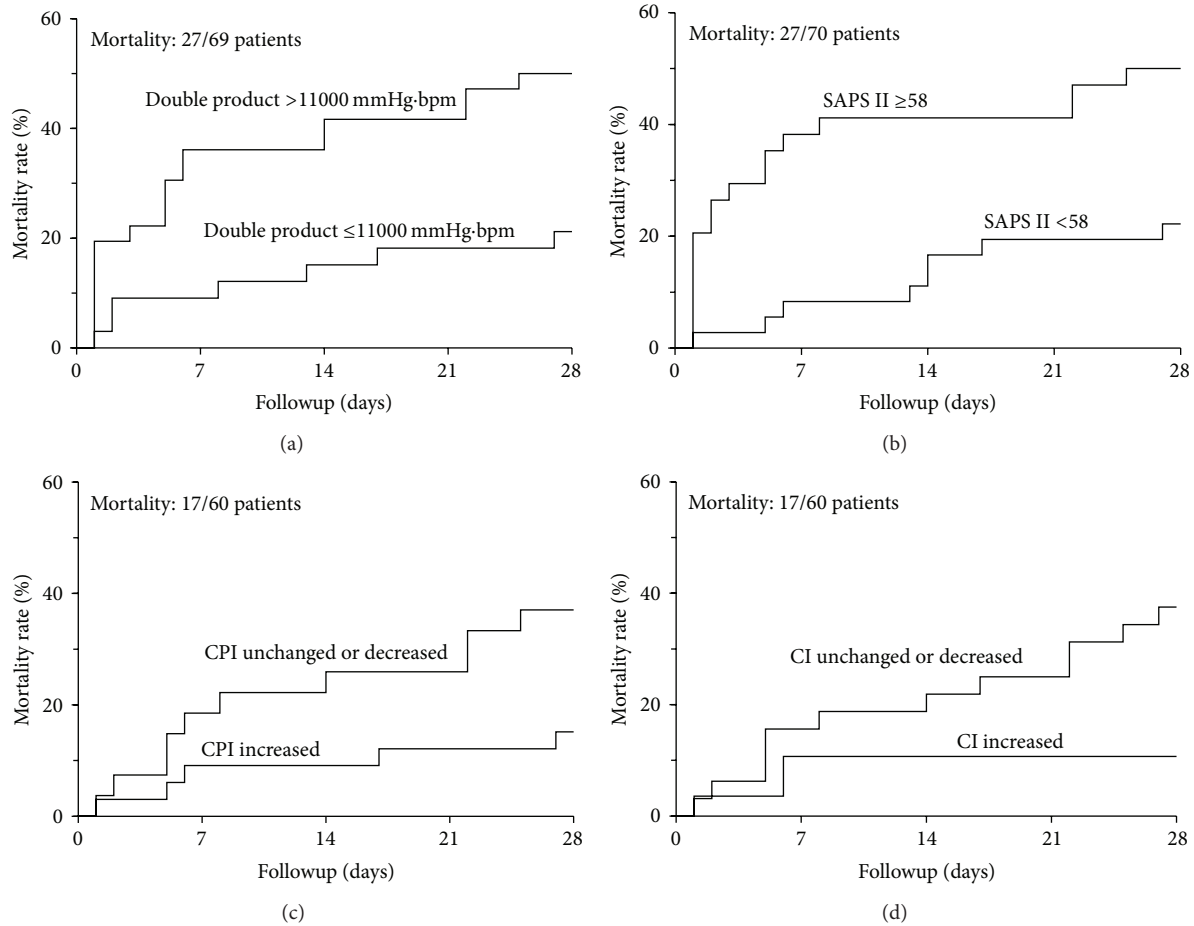


FIGURE 4: Kaplan-Meier curves estimating the rate of death for a Double Product (DP) >11000 mmHg/s (a), a SAPS II >58 (b), a Cardiac Power Index (CPI) and a Cardiac Index (CI) either unchanged or decreased ((c) and (d)). bpm, beats per minute; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score.

nonsurvivors, and it is likely that its use did not influence the interpretation of the findings. Given this particularity, pressure components could be neglected and thus it would appear that patients that were not able to increase their CI displayed a worse prognosis, arguing for worse cardiac performance and inotropism. Similar findings have been reported by Werdan et al. who elegantly demonstrated, using a mathematical model, that it is possible to quantify the severity of septic cardiomyopathy by calculating the expected values of afterload-related CO/CI. Interestingly, these authors found a strong correlation between the intensity of septic cardiomyopathy and prognosis [3]. Of note, in the present study, CCR parameters were associated with prognosis in multivariate analysis while factors related to static cardiac function such as ejection fraction or related to vasoplegia (norepinephrine doses, ISVR) were not. Thus, the severity of septic cardiomyopathy was closely related to prognosis in septic shock. Whether this is a cause or consequence remains to be elucidated.

**5.3. Study Limitations.** This is a pilot, monocentric study with no validation cohort. Nevertheless, the most recent recommendations were followed to reduce the monocenter effect,

and all our patients benefited from high level hemodynamic monitoring (ScVO<sub>2</sub>, lactate, PICCO, echocardiography). We made an effort to optimize the volemic status with a strategy that included fluid responsiveness prediction tests. However, this remained a genuine challenge, and we could not certify that preload dependency was not fully ruled out. Secondly, although we were able to identify patients with a high risk of death likely related to an inadequate CCR, we are currently unable to propose any demonstrated therapy to improve CCR during septic shock. In particular, dobutamine may be inefficient due to downregulation of myocardial  $\beta$ 1-adrenoreceptors and may increase myocardial oxygen consumption [18, 19].

**5.4. Conclusions.** The present study adds significant knowledge regarding the importance of CCR during septic shock. Our results suggest that both CCR at inclusion, assessed using double product, as well as 24-hour CCR are important factors in determining patient prognosis. Importantly, in a therapeutic strategy in which arterial pressure is maintained to preestablished levels using norepinephrine, CCR parameters appear to be more predictive than vasoplegia-related

parameters. Further studies are needed to determine the best therapeutic strategy in patients with decreased CCR.

### Key Messages

- (1) In septic shock patients, contractile cardiac reserve can be easily assessed with a nonpharmacological test.
- (2) At a fixed mean arterial pressure, a high double product at inclusion and a decrease in cardiac index and cardiac power index in the first 24 hours are related to poor outcome.

### Abbreviations

CCR:	Cardiac contractile reserve
CI:	Cardiac index
CPI:	Cardiac power index
CVP:	Central venous pressure
DAP:	Diastolic arterial pressure
DP:	Double product
GEDV:	Global end diastolic volume
HR:	Heart rate
ISVR:	Indexed systemic vascular resistance
LEF:	Left ejection fraction
MAP:	Mean arterial pressure
OR:	Odds ratio
PP:	Pulse pressure
SAP:	Systolic arterial pressure
SAPS II:	Simplified acute physiology score II
ScVO <sub>2</sub> :	Central venous oxygen saturation
SOFA:	Sequential organ failure assessment.

### Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

### Authors' Contribution

Antoine Kimmoun and Nicolas Ducrocq had overall responsibility for this study including study design and execution. They equally participated to the paper development. Sébastien Mory, Rémi Delfosse, Laura Muller, and Pierre Perez included patients. Renaud Fay was an independent statistician and performed the statistical analyses. Bruno Levy was involved in study design and the paper preparation.

### References

- [1] A. Vieillard-Baron, "Septic cardiomyopathy," *Annals of Intensive Care*, vol. 1, no. 1, pp. 1-7, 2011.
- [2] A. Vieillard-Baron, V. Caille, C. Charron, G. Belliard, B. Page, and F. Jardin, "Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock," *Critical Care Medicine*, vol. 36, no. 6, pp. 1701-1706, 2008.
- [3] K. Werdan, A. Oelke, S. Hettwer et al., "Septic cardiomyopathy: Hemodynamic quantification, occurrence, and prognostic implications," *Clinical Research in Cardiology*, vol. 100, no. 8, pp. 661-668, 2011.
- [4] H. Montgomery, "Cardiac reserve: linking physiology and genetics," *Intensive Care Medicine*, vol. 26, supplement 1, pp. S137-S144, 2000.
- [5] R. Fincke, J. S. Hochman, A. M. Lowe et al., "Cardiac power is the strongest hemodynamic correlate of mortality in cardiogenic shock: a report from the SHOCK trial registry," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 44, no. 2, pp. 340-348, 2004.
- [6] M. A. Hayes, A. C. Timmins, E. H. S. Yau, M. Palazzo, D. Watson, and C. J. Hinds, "Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: Influence of treatment and relationship to outcome," *Critical Care Medicine*, vol. 25, no. 6, pp. 926-936, 1997.
- [7] A. H. Sadrzadeh Rafie, G. W. Sungar, F. E. Dewey, D. Hadley, J. Myers, and V. F. Froelicher, "Prognostic value of double product reserve," *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, vol. 15, no. 5, pp. 541-547, 2008.
- [8] R. A. Rhoades and D. R. Bell, *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, 4th edition, 2012.
- [9] T. Kinugawa, K. Ogino, H. Kitamura et al., "Response of sympathetic nervous system activity to exercise in patients with congestive heart failure," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 21, no. 5, pp. 542-547, 1991.
- [10] R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes et al., "Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock," *Critical Care Medicine*, vol. 41, pp. 580-637, 2012.
- [11] L.-B. Tan and W. A. Littler, "Measurement of cardiac reserve in cardiogenic shock: implications for prognosis and management," *British Heart Journal*, vol. 64, no. 2, pp. 121-128, 1990.
- [12] G. Cotter, Y. Moshkovitz, E. Kaluski et al., "The role of cardiac power and systemic vascular resistance in the pathophysiology and diagnosis of patients with acute congestive heart failure," *European Journal of Heart Failure*, vol. 5, no. 4, pp. 443-451, 2003.
- [13] H. Engblom, K. Steding, M. Carlsson et al., "Peak oxygen uptake in relation to total heart volume discriminates heart failure patients from healthy volunteers and athletes," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 12, no. 1, article 74, 2010.
- [14] P. D. Annane, P. E. Bellissant, and J.-M. Cavaillon, "Septic shock," *The Lancet*, vol. 365, no. 9453, pp. 63-78, 2005.
- [15] J. W. Kern and W. C. Shoemaker, "Meta-analysis of hemodynamic optimization in high-risk patients," *Critical Care Medicine*, vol. 30, no. 8, pp. 1686-1692, 2002.
- [16] A. Kumar, E. Schupp, E. Bunnell, A. Ali, B. Milcarek, and J. E. Parrillo, "Cardiovascular response to dobutamine stress predicts outcome in severe sepsis and septic shock," *Critical Care*, vol. 12, no. 2, article R35, 2008.
- [17] B. Vallet, C. Chopin, S. E. Curtis et al., "Prognostic value of the dobutamine test in patients with sepsis syndrome and normal lactate values: a prospective, multicenter study," *Critical Care Medicine*, vol. 21, no. 12, pp. 1868-1875, 1993.
- [18] L. McMartin and R. J. Summers, "Functional analysis of desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor signalling pathway in rat cardiac tissues following chronic isoprenaline infusion," *British Journal of Pharmacology*, vol. 127, no. 4, pp. 1012-1020, 1999.
- [19] J. Stephens, H. Ead, and R. Spurrell, "Haemodynamic effects of dobutamine with special reference to myocardial blood flow. A comparison with dopamine and isoprenaline," *British Heart Journal*, vol. 42, no. 1, pp. 43-50, 1979.

### **Annexe 3 : Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside**

REVIEW

Open Access

# Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside

Antoine Kimmoun<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Novy<sup>1,2</sup>, Thomas Auchet<sup>1</sup>, Nicolas Ducrocq<sup>1</sup> and Bruno Levy<sup>1,2,3\*</sup>

## Abstract

Lactic acidosis is a very common biological issue for shock patients. Experimental data clearly demonstrate that metabolic acidosis, including lactic acidosis, participates in the reduction of cardiac contractility and in the vascular hyporesponsiveness to vasopressors through various mechanisms. However, the contributions of each mechanism responsible for these deleterious effects have not been fully determined and their respective consequences on organ failure are still poorly defined, particularly in humans. Despite some convincing experimental data, no clinical trial has established the level at which pH becomes deleterious for hemodynamics. Consequently, the essential treatment for lactic acidosis in shock patients is to correct the cause. It is unknown, however, whether symptomatic pH correction is beneficial in shock patients. The latest Surviving Sepsis Campaign guidelines recommend against the use of buffer therapy with  $\text{pH} \geq 7.15$  and issue no recommendation for  $\text{pH}$  levels  $< 7.15$ . Furthermore, based on strong experimental and clinical evidence, sodium bicarbonate infusion alone is not recommended for restoring pH. Indeed, bicarbonate induces carbon dioxide generation and hypocalcemia, both cardiovascular depressant factors. This review addresses the principal hemodynamic consequences of shock-associated lactic acidosis. Despite the lack of formal evidence, this review also highlights the various adapted supportive therapy options that could be putatively added to causal treatment in attempting to reverse the hemodynamic consequences of shock-associated lactic acidosis.

## Introduction

Shock was recently redefined as a clinical state of acute circulatory failure with inadequate oxygen utilization and/or delivery by the cells resulting in cellular dysoxia/hypoxia [1]. In this setting, shock-associated lactic acidosis is the principal but not exclusive cause of metabolic acidosis in the shock state. Current clinical practice considers a  $\text{pH} \leq 7.35$  and lactatemia  $> 2.0 \text{ mmol.l}^{-1}$  with a  $\text{PaCO}_2 \leq 42 \text{ mmHg}$  as defining lactic acidosis [2,3]. In contrast, the definition of severe lactic acidosis is unclear. Critical care physicians usually consider that metabolic acidosis with a  $\text{pH} < 7.2$  has deleterious hemodynamic effects and requires symptomatic treatment [4]. Nevertheless, despite optimal management with adequate supportive and etiological therapy, shock and severe lactic acidosis (that is, with  $\text{pH} < 7.2$ ) remain associated with an observed high mortality rate of about

50%, while no survival has been reported for severe lactic acidosis with shock under  $\text{pH} 7.0$  [5-8].

Numerous studies have assessed the cardiovascular consequences of severe metabolic acidosis, including lactic acidosis. These experimental studies demonstrated that severe metabolic acidosis worsens cardiovascular function [9,10] by exacerbating myocardial dysfunction and hyporesponsiveness to vasopressors [11]. Nevertheless, such findings have yet to be formally observed in human studies.

Etiological treatment is essential while symptomatic lactic acidosis correction remains a contentious issue. It is unknown whether alkalinization is beneficial in severe lactic acidosis. The Surviving Sepsis Campaign recommends against symptomatic treatment in lactic acidotic patients with a  $\text{pH} > 7.15$  for the purpose of improving hemodynamic status [2]. Alternatively, the effect of alkalinization on hemodynamics and vasopressor requirements at  $\text{pH} \leq 7.15$  is currently unknown. Nevertheless, despite the lack of relevant results on its efficacy, alkalinization is still largely prescribed in instances of severe acidosis with  $\text{pH} \leq 7.15$  [4].

\* Correspondence: b.levy@chu-nancy.fr

<sup>1</sup>CHU Nancy, Service de Réanimation Médicale Brabois, Pole Cardiovasculaire et Réanimation Médicale, Hôpital de Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy 54511, France

<sup>2</sup>Université de Lorraine, Nancy 54000, France

Full list of author information is available at the end of the article

The present review was written based on a critical and personal appraisal of the literature from 1 January 1980 to 1 December 2014 searched for using the MEDLINE database. The object of the search was the hemodynamic consequences of lactic acidosis during the shock state. The following terms were searched and combined: 'bicarbonate', 'metabolic acidosis', 'lactic acidosis', 'pH', 'shock', 'renal replacement therapy', and 'anion gap acidosis'. In addition, references from each identified article were carefully reviewed for additional suitable references. Studies involving humans or animals were examined, and the search was restricted to articles published in the English language.

This review focuses only on the hemodynamic consequences of severe lactic acidosis with appropriate response of the ventilatory system; that is, pH <7.2,  $PCO_2 \leq 42$  mmHg and lactatemia >5 mmol.l<sup>-1</sup> (approximation based on the Henderson-Hasselbach equation for  $PCO_2 = 42$  mmHg). The complex association of respiratory and metabolic acidosis is not discussed in this article. Symptomatic therapeutic options are also reviewed. However, other types of metabolic acidosis, such as isolated acute renal failure, bicarbonate-losing metabolic acidosis, ketoacidosis, hyperchloremic acidosis or metformin-induced lactic acidosis, are not addressed, aside from specific comparisons.

### **Epidemiology and outcome of severe lactic acidosis**

Lactic acidosis is one of the most common biological concerns for intensivists. Nevertheless, clinical studies assessing the incidence and outcome of lactic acidosis are sparse and are mostly retrospective or prospective in nature with small sample sizes.

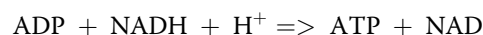
For this review, the most convincing prospective multi-center study, conducted in 2011 by Jung and colleagues [12], noted severe lactic acidosis in 6% of the studied population (200/2,550 patients); that is, with pH  $7.09 \pm 0.11$  with high lactatemia values. Eighty-three percent of these patients were treated with vasopressors with a mortality rate of 57%. In this study, lactatemia and the swiftness of lactic acidosis correction were linked with survival. Interestingly, only 18% exhibited a slight coexistent respiratory acidosis at admission.

Clearly, a causal relationship between lactic acidosis and mortality has yet to be established. For example, in metformin-associated lactic acidosis, even with pH values most often around 7.0, the observed mortality rate was 25% [13]. However, for the same pH values during shock, regardless of origin, no survival was reported [8]. Consequently, severe lactic acidosis is much more of a precipitator than a direct causal factor of mortality. Lactic acidosis probably contributes to the decompensation of underlying comorbidities and, hence, to the mortality rate.

### **Lactate generation in shock states**

As indicated above, lactic acidosis is a common phenomenon in shock patients and a high predictor of mortality. The pathophysiology of shock-associated lactic acidosis is still taught to medical students as a direct marker of oxygen debt or hypoperfusion in tissues (type A lactic acidosis) [14]. Lactate is produced from pyruvate and through the glycolysis cascade. Thus, when pyruvate production exceeds mitochondrial capacity, lactate generation increases.

Far from being the only hypothesis explaining hypoxia-induced hyperlactatemia, numerous other mechanisms are involved, including under aerobic conditions (type B lactic acidosis). Indeed, lactate is first and foremost an energetic, non-toxic substratum. Under resting conditions, half of the total lactate produced (1,500 mmol.day<sup>-1</sup>) is directed toward gluconeogenesis in the liver (Cori cycle) while the remaining 50% is consumed via oxidation [15]. Moreover, the kidney is also involved, acting as a neoglucogenesis-directed metabolizer in the cortex and as a producer of lactate in the medulla. At the cellular level, in response to adrenergic stress in shock patients, accelerated glycolysis enhances lactate production [16]. An elevated lactate/pyruvate ratio is an indicator of a cytoplasmic accumulation of NADH that can be used to regenerate ATP [17]:



Thus, the increase in lactate/pyruvate ratio appears to be much more of an adaptive response to shock-induced energetic debt than an actual side effect [18].

In shock patients, acute liver or renal dysfunctions are most often associated with decreased lactate clearance and a pronounced increase in blood lactate level compared with patients without liver or renal dysfunction. However, liver and renal dysfunctions are inextricably linked with the shock state and their impact on the decreased lactate clearance in this situation remains unclear [19,20].

### **Is hyperlactatemia systematically associated with metabolic acidosis?**

At first glance, it might appear somewhat counterintuitive that lactate, an endogenous non-toxic molecule and an energetic substrate of the neoglucogenesis process, could be, under specific circumstances, the source of lactic acidosis and induce such deleterious consequences for organ function [21].

This discrepancy could be explained by the Stewart-Fencel physicochemical approach. In this model, any acid-base modification is a reflection of water dissociation into protons rather than the accumulation of acid *per se*. Thus, all strong acids such as lactic acid are completely

dissociated at physiological pH in water, thus generating protons [22]. The strong ion difference (SID) is the difference between the sums of the concentrations of the strong cations and strong anions:

$$[\text{SID}] = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}] - [\text{Cl}^-] - [\text{Other strong anions}]$$

In the shock state, therefore, the increase in lactate production and the decrease in the efficiency of lactate clearance at the cellular level result in a net increase in lactate and a drop in intracellular pH. To maintain intracellular pH in physiological ranges (7.15 to 7.25), mono-carboxylate transporters extrude lactate and  $\text{H}^+$  through the plasma membrane [23]. Following the Stewart model, the accumulated extracellular lactate reduces SID and lowers extracellular pH by proton generation.

Thus, according to the Stewart approach, at constant value of chloremia, albuminemia and  $\text{PCO}_2$ , accumulation of lactate is always associated with lactic acidosis [24]. However, lactic acidosis with coexisting metabolic acid–base disturbances (with dyschloremia, adapted or non-adapted  $\text{PCO}_2$ , and so on) is by far the most common situation [25].

### Is lactic acidosis harmful for cardiovascular function?

Regulation of the intracellular and extracellular pH of cardiac or vascular smooth muscle cells (VSMCs) is essential for the maintenance of a stable hemodynamic status. As alluded to above, regardless of the mechanism involved, lactate generation in shock states leads to a drop in intracellular and extracellular pH and most often to hemodynamic failure. Whether this severe lactic acidosis is a causal contributor to multiple organ failure or simply a biomarker of the patient's critical state remains an ongoing debate. In this situation, severe lactic acidosis in experimental studies always causes negative effects on cardiovascular function while its correction negates its protective effects [26]. Again, no human study has so far clearly replicated these same experimental findings.

In the following sections, the hemodynamic consequences of lactic acidosis at both the cellular and functional level are described. However, a cautious interpretation must be made of the available data. In fact, a large portion of the published experimental data used non-organic acid to induce metabolic acidosis. Therefore, the number of relevant and published studies centered on the effects of acidosis induced by an accumulation of extracellular lactate reducing SID and lowering extracellular pH by proton generation is somewhat limited. By hypothetical reasoning, it is usually accepted that the effects of lactic

acidosis may overlap with those of metabolic acidosis. Nevertheless, in the following sections, the manner in which acidosis is induced will be specified for each included reference; that is, the hypoxic lactic acidosis model (LAM) or non-organic acidosis model (NOAM). It is likely that some of the hemodynamic effects reported in hypoxic LAMs are also induced in part by hypoxia [27]. However, the latter remains the most widely used model to induce an endogenous and homogenous shock-associated lactic acidosis. In addition, when acidosis is induced via NOAM, the cited text will systematically carry the mention that the study involved metabolic acidosis including lactic acidosis.

### Lactic acidosis and myocardial cell dysfunction

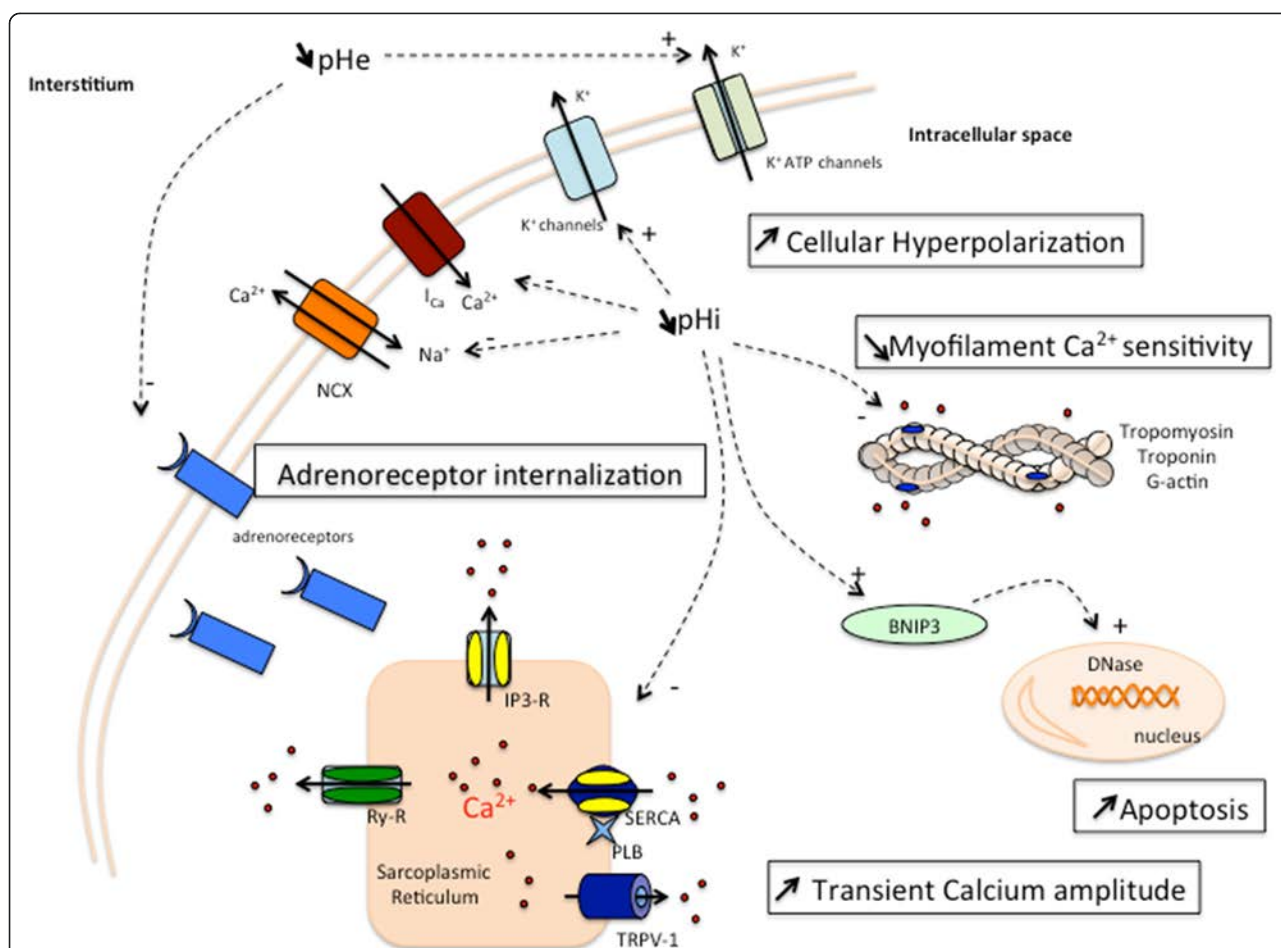
In cardiac cells, the drop in intracellular pH has a considerable impact on the amplitude of the systolic calcium transient and the subsequent excitation-contraction coupling pathway (NOAM) [28] (Figure 1). The net impact of intracellular lactic acidosis is an increase in the calcium transient amplitude due to increased sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content despite a decrease in fractional release (NOAM) [29]. Three major mechanisms globally regulate the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  concentration: 1) desensitization of the ryanodine receptor and decreased calcium release by the sarcoplasmic reticulum (LAM) [29,30]; 2) extrusion of  $\text{H}^+$  via  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange, increasing the intracellular  $\text{Na}^+$  concentration, which stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and further increases the intra-cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (NOAM and LAM) [31,32]; and 3) inhibition of sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) but also phosphorylation of phospholamban, which in turn increases  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from the cytosol by SERCA (NOAM and LAM) [33,34].

Paradoxically, activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE) in order to increase intracellular pH also has the potential of giving rise to deleterious increases in cytosolic calcium and sodium concentrations [35].

Intra- and extracellular lactic acidosis also have an impact on all action potential mechanisms; that is, the delicate balance between inward and outward currents. The current literature, most of which is experimental, reports various effects on action potential depending on the degree and method of acidosis used. One of the most studied aspects in acidosis is the consequence of a change in calcium transient on the action potential and its clinical relevance to cardiac arrhythmias. Schematically, intracellular metabolic acidosis, including of lactic acid origin, as seen above, increases the intracellular calcium transient but also its alternans, which impacts repolarization alternans susceptibility (NOAM) [36].

It has long been known that a drop in intracellular pH not only changes the calcium transient amplitude but also





**Figure 1** Description of the principal pathophysiological effects of severe metabolic acidosis with pH <7.2 on a muscle cell. Transient calcium amplitude: the increase in Ca<sup>2+</sup> transient amplitude is the net consequence of the inhibitory effect of low intracellular pH on RyRs, NCX and I<sub>Ca</sub>, and the stimulatory effects of low intracellular pH on NHE, NBC, TRPV-1 and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>. Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity: due to the low intracellular pH, Ca<sup>2+</sup> binding to troponin is altered and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity decreased. Cellular hyperpolarization: intracellular acidosis also enhances hyperpolarization through K<sup>+</sup> extrusion. Apoptosis: intracellular acidosis has stimulatory effects on BNIP3, promoting apoptosis. Adrenoreceptors: extracellular and intracellular acidosis reduces the number of adrenoreceptors on the cell membrane. I<sub>Ca</sub>, L-type Ca<sup>2+</sup> channel; IP3-R, inositol-1,4,5-triphosphate receptor; NBC, Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transport; NCX, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange; NHE, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange; pHe, extracellular pH; pHi, intracellular pH; PLB, phospholamban; Ry-R, ryanodine receptor; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; SR, sarcoplasmic reticulum; TRPV-1, transient receptor potential channels-1.

alters Ca<sup>2+</sup> binding to troponin C (NOAM and LAM) [37,38]. This effect occurs not only in severe but also mild acute metabolic acidosis (LAM) [39].

The consequences of lactic acidosis on the apoptosis pathway have been widely investigated in myocardial ischemia models but poorly studied in sepsis-induced cardiovascular dysfunction. Among the numerous studied mechanisms, BNIP3, a member of the Bcl-2 pro-apoptotic protein family, mainly contributes to cardiomyocyte cell death (LAM) [40,41]. Undetectable in healthy cells, hypoxic conditions such as myocardial infarction or trauma-hemorrhage injury promote *BNIP3* gene expression and its accumulation in the cytoplasm. However, only the association of hypoxia with intracellular lactic acidosis

induces the activation of the death pathway (LAM) [42]. Under intracellular lactic acidosis conditions, BNIP3 translocates into the mitochondrial membrane, thereby opening the mitochondrial permeability transition pore. Thereafter, mitochondria subsequently release pro-apoptotic factors (cytochrome c, apoptosis-inducing factors, and so on) that stimulate nuclear translocation of DNase without activation of caspases (LAM) [40]. Other mechanisms, described in experimental endothelial cell models of ischemic acidosis, involve accumulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> leading to the activation of caspases and apoptosis (LAM) [43]. Finally, the drop in extracellular pH also reduces the number of beta-adrenoreceptors on myocardial cell surfaces (NOAM) [44].

**Lactic acidosis and vascular smooth muscle cell dysfunction**

Metabolic acidosis, including lactic acidosis, induces significant effects on VSMCs in close relationship with endothelial cells (Figure 1). Lactic acidosis initiates multiple cascades of intracellular signaling reactions in both endothelial cells and VSMCs.

As in myocardial cells, intracellular metabolic acidosis, including lactic acidosis, also alters the calcium transient and reduces the number of adrenoceptors on the cell surface (NOAM) [11,45]. More specifically, lactic acidosis induces vascular smooth muscle relaxation via the opening of ATP-sensitive potassium channels (NOAM and LAM) [46,47].

Widely demonstrated, metabolic acidosis, including lactic acidosis, also leads to the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelium and VSMCs. Overproduction of nitric oxide has a direct vasodilator effect on VSMCs (NOAM and LAM) [48-51].

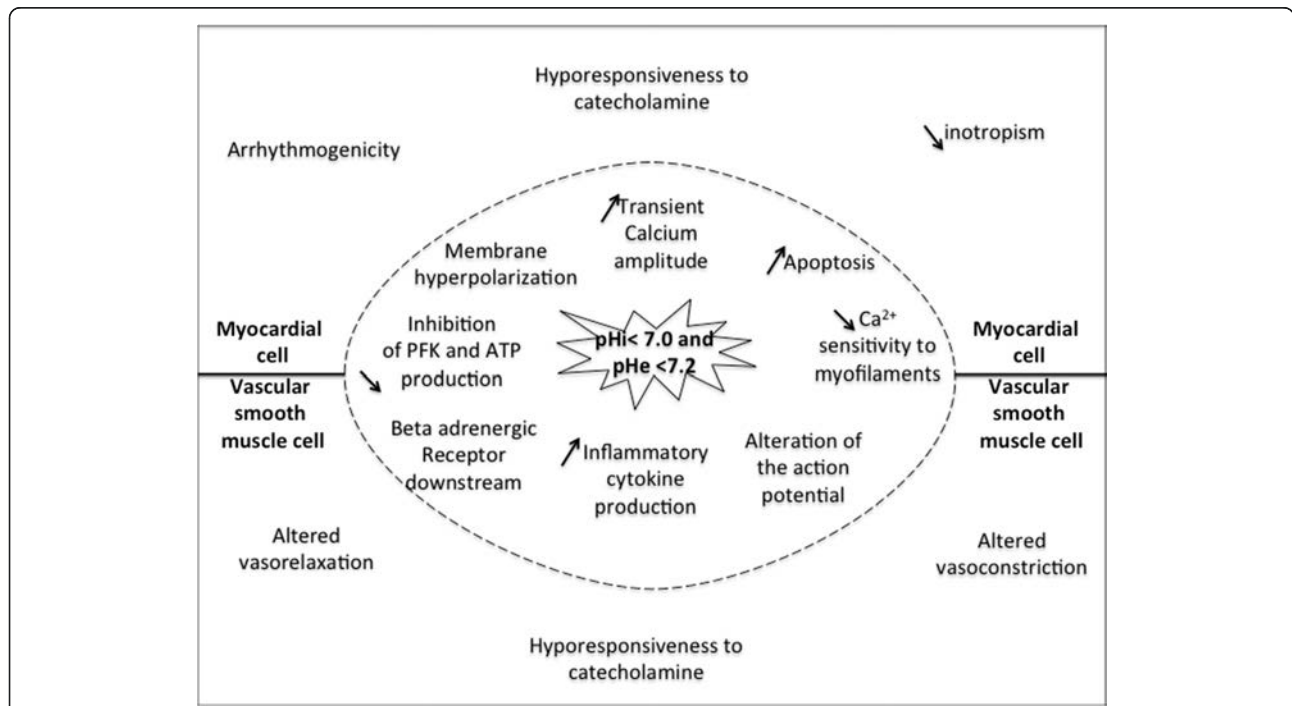
Intracellular pH regulation in VSMCs is partly dependent on transmembrane movement of acid/base equivalents. Three well-characterized channels are known to be involved in intracellular pH regulation: 1) the NHE, which extrudes proton in exchange for sodium (NOAM); 2) the  $Cl^-/HCO_3^-$  exchanger, which maintains a high concentration of intracellular chloride and is activated in response to intracellular alkalinization (NOAM); and 3)  $Na^+/HCO_3^-$

co-transport, which is also stimulated by a drop in intracellular pH (NOAM) [52-55].

**Functional myocardial consequences of severe lactic acidosis**

Lactic acidosis has been known for over 50 years to impair cardiac function [56-59] (Figure 2). In isolated rabbit hearts, Berger and colleagues elegantly demonstrated that lactic acidosis depressed ventricular elastance (LAM) [9]. In an *in vivo* model of severe lactic acidosis induced by hemorrhagic shock, inotropism assessed by a conductance catheter was also altered (LAM) [60]. However, human studies are lacking on this specific subject. A recent study on isolated human ventricular trabeculae showed that a mild metabolic acidosis, including lactic acidosis, reduced both contractility and beta-adrenergic response to isoproterenol (NOAM) [39]. Other experimental studies also confirm the metabolic/lactic acidosis-induced hyporesponsiveness to inotropic agents (NOAM) [44,61]. Despite sparse data, metabolic acidosis, including lactic acidosis, also appears to depress myocardial relaxation assessed in isolated heart or by echocardiography (NOAM) [62,63].

Conversely, the literature is extensive on targeting of the pathophysiology of metabolic acidosis in cardiac arrhythmias, mainly in ischemia-reperfusion models. By increasing cellular calcium transient alternans, metabolic acidosis, including lactic acidosis, also promotes



**Figure 2** Schematic representation of cellular and functional consequences in myocardial and vascular smooth muscle cells in instances of severe lactic acidosis. The same mechanisms are involved in both cell types but with specific functional consequences. PFK, phospho-fructo-kinase; pHe, extracellular pH; pHi, intracellular pH.

repolarization alternans susceptibility (NOAM) [36]. Indeed, repolarization wave alternans has been shown to be a prognostic marker for the occurrence of severe arrhythmias such as ventricular fibrillation [64,65].

#### Functional vascular consequences of severe lactic acidosis

Both *in vivo* and *ex vivo* experimental studies have clearly demonstrated that severe lactic acidosis is associated with major deleterious vascular consequences, although these effects have not been formally demonstrated in humans (Figure 2). Experimentally, the reduction in contractile response to increasing doses of phenylephrine defines vascular hyporesponsiveness to vasopressors. For example, in a myography chamber, segments of healthy rat arterial vessels exposed to a severe acidotic medium displayed a reduced contractile response to phenylephrine or potassium (NOAM and LAM) [10,60,66,67]. However, vascular response assessed by changes in vascular tone to catecholamines does not necessarily translate into a resulting change in mean arterial pressure. Indeed, arterial pressure is measured in compliance vessels, which represent only 30% of systemic vascular resistances. Relaxation of arterial vessels is also decreased by severe metabolic acidosis, including lactic acidosis, although this aspect is less well documented (NOAM) [68].

There is no clear, published definition of vascular hyporesponsiveness to vasopressor therapy in clinical practice. The inability to increase arterial pressure despite high vasopressor doses in shock patients could be one suggested definition. However, there are currently no available human data using this definition and demonstrating a direct imputable link between lactic acidosis and impaired vascular function.

#### Potential beneficial effect of acidosis related to hyperlactatemia

In addition to the known deleterious effects of acidosis, experimental studies prior to 1980 reported several examples of the beneficial effect of moderate metabolic (including lactic) acidosis on hemodynamics [69]. Thus, recent literature has emerged regarding the potential favorable effects of mild acidosis, particularly in the setting of cardiac surgery in order to reduce the harmful effects of postoperative ischemia-reperfusion.

For instance, in a canine model of coronary ischemic-reperfusion syndrome, Fujita and colleagues [70] reported that prolonged transient acidosis during early reperfusion was found to reduce myocardial injuries (LAM). These unintuitive effects of acidosis may be related to the decrease in calcium overload, which attenuates myocardial consumption [71]. Acidosis also attenuates neutrophil activation and free radical generation [72]. Moreover, nitric oxide and adenosine release are enhanced,

contributing to protecting the heart from reperfusion injury (LAM) [73,74].

Under acidotic conditions, the sigmoid HbO<sub>2</sub> dissociation curve undergoes a rightward shift, resulting in a decrease in SaO<sub>2</sub> and an increase in tissue O<sub>2</sub> delivery. Due to the shape of the HbO<sub>2</sub> curve, the effects of such a shift are usually insignificant at normal PO<sub>2</sub> levels but are critical at low PO<sub>2</sub> levels [75]. *In vitro* studies have determined that acidosis activates ATP-sensitive potassium channels leading to vasorelaxation via membrane hyperpolarization [76]. This in turn may increase microvascular flow and thus contribute to the reperfusion syndrome. Finally, even if counterintuitive, acidosis reduces ATP production and energy expenditure, which could lead, at a cellular level, to a protective effect against death [77].

#### Is there any proven benefit of systemic alkalinization in severe metabolic (including lactic) acidosis?

Literature regarding the potential beneficial effect of alkalinization in correcting metabolic acidosis is controversial. As reported above, severe lactic acidosis with pH  $\leq 7.15$  appears to be experimentally detrimental for organ functions. Consequently, even if not formally demonstrated in clinical trials, it would appear reasonable to quickly correct the pH in order to restore cellular functions. In the absence of conclusive clinical studies, however, most of the following treatment options are consequently based on experimental data.

#### Sodium bicarbonate

Sodium bicarbonate has been removed from the treatment algorithm in advanced cardiac life support [78]. The Surviving Sepsis Campaign also recommends against the use of sodium bicarbonate therapy for the purpose of improving hemodynamics or reducing vasopressor requirements in patients with severe lactic acidosis with pH  $> 7.15$  [2]. Despite these strong guidelines, in the most recent survey on this topic, 67% of intensivists recommend administration of base to patients with metabolic acidosis, including lactic acidosis. The blood pH at which base therapy should be initiated remains nonetheless controversial. Thirty-seven percent of these intensivists continue to begin symptomatic treatment of metabolic acidosis for a pH  $\geq 7.1$  [4]. Such discrepancy between the literature and bedside practice warrants further explanation.

Clinical studies investigating sodium bicarbonate therapy in situations of severe lactic acidosis have always reported an increase in extracellular pH whereas experimental data are more divergent. By contrast, intracellular pH always decreases after sodium bicarbonate administration (Table 1). The main explanation for this so-called paradoxical intracellular acidosis is based on the

**Table 1 Reported effects of Sodium Bicarbonate on intracellular and extracellular pH, hemodynamics and mortality in *in vivo* experimental and clinical studies**

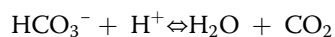
Study	Experimental (E) or human (H)	Methodology (intervention/subjects/protocol/measurements)	Increased PaCO <sub>2</sub> after alkalization in HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> group?	Decreased or unchanged pHe or pH <sub>i</sub> after alkalization in HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> group or compared with other groups?	Shock associated lactic acidosis?	Positive effects of sodium bicarbonate on hemodynamics (arterial pressure/cardiac index) <sup>a</sup>	Positive impact of sodium bicarbonate on mortality <sup>b</sup>
<b>Kim et al. 2013</b> [112]	H	Retrospective. 103 patients with lactic acidosis. Effects of HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> on survival	NA	NA	Yes	NA	NA
<b>Wilson et al. 2013</b> [81]	H	Retrospective series. Severe acidotic trauma patients. Effects of HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> on survival, PaCO <sub>2</sub> , pH	Yes	pHe: no pHi: NA.	Yes	NA	NA
<b>Levrant et al. 2000</b> [113]	H	Mild metabolic acidosis in non-shock patients. Effects of a bicarbonate load on CO <sub>2</sub> generation depending on non-bicarbonate buffer	Yes	pHe: no pHi: no	No	NA	NA
<b>Nielsen et al. 2002</b> [114]	H	5-minute rhythmic handgrip to provoke intracellular acidosis. Healthy subjects. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on arterial pH, and muscle pHi, PaCO <sub>2</sub>	Yes	pHe: no pHi: no	No	NA	NA
<b>Nakashima et al. 1996</b> [115]	H	Healthy subjects. Effects of HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> infusion on cerebral blood flow, PaCO <sub>2</sub> and pHi	Yes	pHe: no pHi: yes	No	NA	NA
<b>Leung et al. 1994</b> [100]	H	Metabolic acidosis in patients undergoing surgery. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. carbicarb. Effects on pHe, hemodynamics	NA	pHe: no pHi: NA	No	No	NA
<b>Mark et al. 1993</b> [116]	H	Intraoperative mild acidosis. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effects on PaCO <sub>2</sub> , pH, hemodynamics	Yes	pHe: no pHi: NA	No	NA	NA
<b>Fanconi et al. 1993</b> [117]	H	Neonatal acidosis. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> before-after study. Effect on hemodynamics, pH, PaCO <sub>2</sub> , PtCO <sub>2</sub>	Yes	pHe: no pHi: NA	Yes	Yes	NA
<b>Mathieu et al. 1991</b> [92]	H	Septic shock. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on arterial pH, PaCO <sub>2</sub> , hemodynamics	Yes	pHe: no pHi: NA	Yes	No	NA
<b>Cooper et al. 1990</b> [89]	H	Septic shock. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on arterial pH, PaCO <sub>2</sub> , hemodynamics	Yes	pHe: no pHi: NA	Yes	No	NA
<b>Bersin et al. 1989</b> [118]	H	Congestive heart disease. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on acidosis, PaCO <sub>2</sub> , hemodynamics (myocardial oxygen consumption)	Yes	pHe: no pHi: NA	No	No	NA
<b>Kimmoun et al. 2014</b> [60]	E	Hemorrhagic shock. Rats. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> with calcium adjunction and increased respiratory rate. Effect on pHe, muscle pHi, hemodynamics	No	pHe: No pHi: No	Yes	Yes	NA

**Table 1 Reported effects of Sodium Bicarbonate on intracellular and extracellular pH, hemodynamics and mortality in *in vivo* experimental and clinical studies (Continued)**

<b>Valenza et al. 2012</b> [84]	E	Lactic acid infusion. Rats. Lactic acidosis vs. lactic acidosis + sodium bicarbonate. Effects on hemodynamics, pHe, lactate, phosphofructokinase.	Yes	pHe: No pHi: NA	No	No	NA
<b>Beech et al. 1994</b> [87]	E	Hypovolemic shock. Rats. Carbicarb vs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . Muscle pHi, PaCO <sub>2</sub> and hemodynamics	Yes	pHe: No pHi: Yes	Yes	No	NA
<b>Bollaert et al. 1994</b> [79]	E	Endotoxin shock. Rats. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on arterial pH, PaCO <sub>2</sub> , muscle pHi, hemodynamics	Yes	pHe: No pHi: Yes	Yes	No	NA
<b>Rhee et al. 1993</b> [83]	E	Hypoxic lactic acidosis. Mongrel dogs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. Carbicarb vs. saline. Effects on PaCO <sub>2</sub> , hemodynamics	Yes	pHe: Yes pHi: Yes	Yes	No	NA
<b>Cooper et al. 1993</b> [88]	E	L-lactic infusion. Pigs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effects on pH, hemodynamics	Per protocol ventilation adjustment	pHe: No pHi: NA.	Yes	No	NA
<b>Shapiro et al. 1990</b> [119]	E	Ammonium chloride-induced metabolic acidosis. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. Carbicarb. Effects on PaCO <sub>2</sub> , pHe, hepatic pHi, hemodynamics	Yes	pHe: No pHi: Yes	No	No	NA
<b>Dimlich et al. 1988</b> [120]	E	Low-flow-induced lactic acidosis. Rats. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. NaDCA vs. NaCl. Effects on pH, lactatemia	NA	pHe: No pHi: NA.	Yes	No	NA
<b>Iberty et al. 1988</b> [91]	E	Hemorrhagic shock. Dogs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effect on hemodynamics, pH, PaCO <sub>2</sub>	Yes	pHe: Yes pHi: NA.	Yes	No	NA
<b>Hope et al. 1988</b> [121]	E	Incomplete cerebral ischemia in lamb. Effects of glucose and HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> on cerebral pHi, PaCO <sub>2</sub> and PtiCO <sub>2</sub>	Yes	pHe: No pHi: Yes	No	NA	NA
<b>Sessler et al. 1987</b> [122]	E	Lactic acidosis treatment in neonatal rabbits. Effect of HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> on pHi and pHe and PaCO <sub>2</sub>	Yes	pHe: no pHi: no	Yes	NA	NA
<b>Graf et al. 1985</b> [90]	E	Hypoxic lactic acidosis. Dogs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline vs. no therapy. Effects on pHe and hemodynamics	NA	pHe: yes pHi: NA	Yes	No	No
<b>Graf et al. 1985</b> [123]	E	Hypoxic lactic acidosis. Dogs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline. Effects on pHe and hepatic pHi	Yes	pHe: yes pHi: yes	Yes	No	No
<b>Arieff et al. 1982</b> [82]	E	Phenformin-induced lactic acidosis. Dogs. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs. saline vs. placebo. Effects on pHe, pHi, hemodynamics	NA	pHe: yes pHi: yes	Yes	No	No

<sup>a</sup>Only applicable in comparative studies with critical patients or experimental models. <sup>b</sup>Only applicable in comparative studies with critical patients or experimental models. NA, not applicable; pHe, extracellular pH; pHi, intracellular pH.

reaction of sodium bicarbonate with a proton to form water and carbon dioxide:



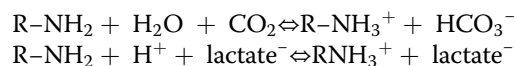
This large generation of carbon dioxide has been observed in all previous clinical and experimental studies (Table 1). Carbon dioxide rapidly diffuses across the cell membrane, resulting in intracellular hypercapnic acidosis, which impairs organ function [79-81]. The rise in carbon dioxide partial pressure also increases hemoglobin affinity for oxygen and may, therefore, decrease oxygen delivery. The rise in lactate after bicarbonate administration, noted in many studies, could be the consequence of this impaired oxygen delivery to tissues [82,83]. Furthermore, upon administration of bicarbonate, the generated alkalosis favors glucose metabolism. Consequently, glucose levels decrease more rapidly than lactate levels, thus worsening hyperlactatemia. Moreover, compared with low pH levels, lactate oxidation is reduced when pH increases [84]. Moreover, bicarbonate decreases ionized calcium, which, as discussed above, plays a pivotal role in cellular contraction [60,85,86]. It is thus not surprising that experimental and human studies assessing the effects of sodium bicarbonate effects in shock patients with severe lactic acidosis have not shown any improvement in cardiovascular function [82,83,87-92]. Therefore, as suggested by Boyd and Walley [85], it is likely that all potential beneficial effects of sodium bicarbonate therapy have been dampened by these two major side effects. A recent experimental study determined the cardiovascular effects of an adapted sodium bicarbonate therapy that included the prevention of both carbon dioxide increase and ionized calcium decrease in a model of severe lactic acidosis induced by hemorrhagic shock. The main finding was that bicarbonate therapy in this specific setting improved both cardiac and vascular function in addition to raising intra- and extracellular pH [60].

In light of these data, bicarbonate therapy might be useful in critical situations in the expectation of specific etiological treatment efficacy. Translating these results to the clinical bedside needs to be confirmed in clinical trials aimed at determining which patients may benefit from this strategy. The design of such a study would likely be difficult to develop and entail several difficulties.

#### THAM and carbicarb

Given the side effects of sodium bicarbonate, other alkali therapies have been developed. THAM (tris-hydroxymethyl-aminomethane) and carbicarb (equimolar mixture of sodium bicarbonate and sodium carbonate) constitute the two most prominent molecules in this context.

THAM buffers protons and particularly carbon dioxide, as described in the following reactions:



THAM diffuses into the intracellular space in non-ionized form and is able to raise intracellular pH [93]. In theory, its use should represent an interesting option; however, its effects on pH are limited over time by its immediate urinary excretion. Due to its toxicity (hyperkalemia), its usefulness in the critical care setting is reduced in instances of significant renal impairment with a glomerular filtration rate under 30 ml.minute<sup>-1</sup>.

In experimental studies, the buffering capacity of THAM is comparable to that of bicarbonate but without the generation of carbon dioxide [94]. In a blood-perfused isolated heart model with a pH lowered to 7.0, THAM also partially corrects pH and improves myocardial contractility and relaxation. Interestingly, a mixture of sodium bicarbonate with THAM has been shown to enable a complete recovery of pH, improve myocardial function and prevent intracellular paradoxical acidosis [95]. Clinical trials in critical patients with relevant lactic acidosis assessing the efficacy and/or the hemodynamic effects of THAM versus other alkali therapies are alas methodologically poor. The most recent randomized study included only 18 patients with mild metabolic (including lactic) acidosis. The authors concluded that THAM and sodium bicarbonate had similar alkalinizing effects [96]. More robust randomized and controlled studies assessing cardiovascular function would be of valuable interest in determining which patients may benefit from this therapeutic option.

THAM also has considerable side effects, including hepatic failure, hyperkalemia, hypoglycemia and, if the molecule is infused via a peripheral venous access, a potential risk of extravasation and cutaneous necrosis [97]. Hence, although an interesting agent, its usefulness remains questionable, particularly in the case of acute renal failure, which is a frequent clinical setting in the intensive care unit.

Carbicarb was also developed in order to reduce carbon dioxide generation. This molecule, in theory, would limit the drop in intracellular pH compared with that induced by a bicarbonate load. Experimental studies in dogs comparing carbicarb versus bicarbonate therapy showed the superiority of carbicarb in improving intracellular pH and cardiac output [98,99]. In patients who developed metabolic acidosis while undergoing major surgery, carbicarb demonstrated its superiority compared with sodium bicarbonate therapy in improving cardiac output with no deleterious side effects [100]. As above, however, no relevant clinical trials have been performed in situations of more severe acidosis.

### Renal replacement therapy

While sodium bicarbonate remains a controversial therapy in instances of severe lactic acidosis, it is somewhat remarkable that renal replacement therapy (RRT), which also provides a significant amount of bicarbonate buffer, is very rarely discussed.

Similarly to the modified bicarbonate therapy, RRT could be initiated in case of an uncontrolled shock state mainly attributed to concomitant severe lactic acidosis. Two modalities could be envisaged: intermittent hemodialysis (IHD) and continuous veno-venous hemofiltration (CVVHF). Compared with IHD, CVVHF corrects pH more rapidly. Moreover, because of its permanent rebalancing effects on acid–base status, CVVHF therapy is preferred to IHD [101]. Thus, CVVHF should be preferred to IHD.

Many studies have also compared various buffer solutions. Under physiological conditions, acetate and lactate are metabolized into bicarbonate and carbon dioxide. However, during shock states, the metabolic rate of lactate or acetate may be reduced due to liver failure. As demonstrated by Tan and colleagues [102], even without hepatic failure, RRT with a lactate buffer solution induces iatrogenic hyperlactatemia associated with an acidifying effect. Accordingly, during the shock state or in instances of multiple organ failure, including hepatic dysfunction, the use of a bicarbonate buffer solution is warranted [103].

The optimal intensity of CVVHF therapy is unclear, particularly for the correction of the acid–base status. In critically ill patients with acute kidney injury, however, high-volume CVVHF does not reduce mortality at 90 days [104]. Finally, a recent study demonstrated that, in patients with mild metabolic, mainly non-lactic acidosis and acute renal failure, standard and high-volume CVVHF had similar effects on acid base status [105]. As suggested by the Surviving Sepsis Campaign guidelines, a typical dose of 20 to 25 ml.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> is recommended [2].

Although efficient in normalizing pH, beneficial effects of CVVHF on hemodynamics are not yet convincing. Indeed, trials on the beneficial hemodynamic effects of CVVHF are mostly non-randomized with low statistical power [105–108]. Furthermore, the effects of RRT on intracellular pH are poorly described in the literature.

### Therapeutic perspectives

As presented above, alkalinization with base does not necessarily result in improved cellular or hemodynamic functions and survival rate [25]. Targeting the pH regulatory protein NHE could represent an innovative approach to lactic acidosis management. NHE activation results in intracellular sodium and calcium overloads, which exert deleterious effects on cardiovascular function [109]. A recent experimental study, with a relevant LAM,

demonstrated that sabiporide improved myocardial function, reduced systemic inflammation and prevented multiple organ failure [110]. An ensuing experimental study with a clinically relevant model of septic shock also demonstrated similar effects [111].

### Conclusion

Deleterious hemodynamic effects of severe lactic acidosis are largely suggested by experimental data, although not fully confirmed by human studies. Pending the effectiveness of an etiological treatment, there is no efficient and validated symptomatic therapy at hand to correct a life-threatening metabolic acidosis. Upcoming research in this field should be focused on the optimal strategy to treat severe metabolic acidosis, including symptomatic therapy.

### Abbreviations

CVVHF: Continuous veno-venous hemofiltration; IHD: Intermittent hemodialysis; LAM: Lactic acidosis model; NHE: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; NOAM: Non-organic acidosis model; RRT: Renal replacement therapy; SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; SID: Strong ion difference; THAM: Tris-hydroxymethyl-aminomethane; VSMC: Vascular smooth muscle cell.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Acknowledgments

We thank Pierre Pothier for the English manuscript proofreading service.

### Author details

<sup>1</sup>CHU Nancy, Service de Réanimation Médicale Brabois, Pole Cardiovasculaire et Réanimation Médicale, Hôpital de Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy 54511, France. <sup>2</sup>Université de Lorraine, Nancy 54000, France. <sup>3</sup>INSERM U1116, Groupe Choc, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy 54511, France.

Published online: 09 April 2015

### References

- Ceccconi M, De Backer D, Antonelli M, Beale R, Bakker J, Hofer C, et al. Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 2014;40:1795–815.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Crit Care Med.* 2013;41:580–637.
- Morris CG, Low J. Metabolic acidosis in the critically ill: part 1. Classification and pathophysiology. *Anaesthesia.* 2008;63:294–301.
- Kraut JA, Kurtz I. Use of base in the treatment of acute severe organic acidosis by nephrologists and critical care physicians: results of an online survey. *Clin Exp Nephrol.* 2006;10:111–7.
- Noritomi DT, Soriano FG, Kellum JA, Cappi SB, Biselli PJ, Liborio AB, et al. Metabolic acidosis in patients with severe sepsis and septic shock: a longitudinal quantitative study. *Crit Care Med.* 2009;37:2733–9.
- Smith I, Kumar P, Molloy S, Rhodes A, Newman PJ, Grounds RM, et al. Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. *Intensive Care Med.* 2001;27:74–83.
- Bakker J, Nijsten MW, Jansen TC. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. *Ann Intensive Care.* 2013;3:12.
- Friesecke S, Abel P, Roser M, Felix SB, Runge S. Outcome of severe lactic acidosis associated with metformin accumulation. *Crit Care.* 2010;14:R226.
- Berger DS, Fellner SK, Robinson KA, Vlasica K, Godoy IE, Shroff SG. Disparate effects of three types of extracellular acidosis on left ventricular function. *Am J Physiol.* 1999;276:H582–94.

10. Otter D, Austin C. Simultaneous monitoring of vascular contractility, intracellular pH and intracellular calcium in isolated rat mesenteric arteries; effects of weak bases. *Exp Physiol*. 2000;85:349–51.
11. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med*. 2010;36:2019–29.
12. Jung B, Rimmel T, Le Goff C, Chanques G, Corne P, Jonquet O, et al. Severe metabolic or mixed acidemia on intensive care unit admission: incidence, prognosis and administration of buffer therapy. A prospective, multiple-center study. *Crit Care*. 2011;15:R238.
13. Kajibaf F, Lalau JD. Mortality rate in so-called “metformin-associated lactic acidosis”: a review of the data since the 1960s. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2014;23:1123–7.
14. Barbee RW, Reynolds PS, Ward KR. Assessing shock resuscitation strategies by oxygen debt repayment. *Shock*. 2010;33:113–22.
15. Richter EA, Kiens B, Saltin B, Christensen NJ, Savard G. Skeletal muscle glucose uptake during dynamic exercise in humans: role of muscle mass. *Am J Physiol*. 1988;254:E555–61.
16. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE. Relation between muscle Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet*. 2005;365:871–5.
17. Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care*. 2006;12:315–21.
18. Wutrich Y, Barraud D, Conrad M, Cravoisy-Popovic A, Nace L, Bollaert PE, et al. Early increase in arterial lactate concentration under epinephrine infusion is associated with a better prognosis during shock. *Shock*. 2010;34:4–9.
19. Juneja D, Singh O, Dang R. Admission hyperlactatemia: causes, incidence, and impact on outcome of patients admitted in a general medical intensive care unit. *J Crit Care*. 2011;26:316–20.
20. Tsai MH, Chen YC, Lien JM, Tian YC, Peng YS, Fang JT, et al. Hemodynamics and metabolic studies on septic shock in patients with acute liver failure. *J Crit Care*. 2008;23:468–72.
21. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Stress hyperlactatemia: present understanding and controversy. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:339–47.
22. Morris CG, Low J. Metabolic acidosis in the critically ill: part 2. Causes and treatment. *Anaesthesia*. 2008;63:396–411.
23. Broer S, Schneider HP, Broer A, Rahman B, Hamprecht B, Deitmer JW. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J*. 1998;333:167–74.
24. Langer T, Carlesso E, Protti A, Monti M, Comini B, Zani L, et al. In vivo conditioning of acid–base equilibrium by crystalloid solutions: an experimental study on pigs. *Intensive Care Med*. 2012;38:686–93.
25. Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. *N Engl J Med*. 2014;371:2309–19.
26. Teplinsky K, O’Toole M, Olman M, Walley KR, Wood LD. Effect of lactic acidosis on canine hemodynamics and left ventricular function. *Am J Physiol*. 1990;258:H1193–9.
27. Regueira T, Djafarzadeh S, Brandt S, Gorrasi J, Borotto E, Porta F, et al. Oxygen transport and mitochondrial function in porcine septic shock, cardiogenic shock, and hypoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56:846–59.
28. Crampin EJ, Smith NP, Langham AE, Clayton RH, Orchard CH. Acidosis in models of cardiac ventricular myocytes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2006;364:1171–86.
29. Choi HS, Trafford AW, Orchard CH, Eisner DA. The effect of acidosis on systolic Ca<sup>2+</sup> and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2000;529:661–8.
30. Dong LW, Wu LL, Ji Y, Liu MS. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis. *Shock*. 2001;16:33–9.
31. Harrison SM, Frampton JE, McCall E, Boyett MR, Orchard CH. Contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and H<sup>+</sup> during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1992;262:C348–57.
32. Sikes PJ, Zhao P, Maass DL, White J, Horton JW. Sodium/hydrogen exchange activity in sepsis and in sepsis complicated by previous injury: 31P and 23Na NMR study. *Crit Care Med*. 2005;33:605–15.
33. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:67–74.
34. Wu LL, Tang C, Dong LW, Liu MS. Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. *Shock*. 2002;17:389–93.
35. Wu D, Kraut JA. Potential role of NHE1 (sodium-hydrogen exchanger 1) in the cellular dysfunction of lactic acidosis: implications for treatment. *Am J Kidney Dis*. 2011;57:781–7.
36. Kapur S, Wasserstrom JA, Kelly JE, Kadish AH, Aistrup GL. Acidosis and ischemia increase cellular Ca<sup>2+</sup> transient alternans and repolarization alternans susceptibility in the intact rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H1491–512.
37. Blanchard EM, Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res*. 1984;55:382–91.
38. Ming MJ, Hu D, Chen HS, Liu LM, Nan X, Hua CH, et al. Effect of MCI-154, a calcium sensitizer, on calcium sensitivity of myocardial fibers in endotoxic shock rats. *Shock*. 2000;14:652–6.
39. Schotola H, Toischer K, Popov AF, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. Mild metabolic acidosis impairs the beta-adrenergic response in isolated human failing myocardium. *Crit Care*. 2012;16:R153.
40. Graham RM, Frazier DP, Thompson JW, Haliko S, Li H, Wasserlauf BJ, et al. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol*. 2004;207:3189–200.
41. Jian B, Wang D, Chen D, Voss J, Chaudry I, Raju R. Hypoxia-induced alteration of mitochondrial genes in cardiomyocytes: role of Bnip3 and Pdk1. *Shock*. 2010;34:169–75.
42. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12825–30.
43. Kumar S, Kasseckert S, Kostin S, Abdallah Y, Schafer C, Kaminski A, et al. Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12. *Cardiovasc Res*. 2007;73:172–80.
44. Marsh JD, Margolis TI, Kim D. Mechanism of diminished contractile response to catecholamines during acidosis. *Am J Physiol*. 1988;254:H20–7.
45. Ives SJ, Andtbacka RH, Noyes RD, Morgan RG, Gifford JR, Park SY, et al. alpha1-Adrenergic responsiveness in human skeletal muscle feed arteries: the impact of reducing extracellular pH. *Exp Physiol*. 2013;98:256–67.
46. Ishizaka H, Kuo L. Acidosis-induced coronary arteriolar dilation is mediated by ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1996;78:50–7.
47. Kuo JH, Chen SJ, Shih CC, Lue WM, Wu CC. Abnormal activation of potassium channels in aortic smooth muscle of rats with peritonitis-induced septic shock. *Shock*. 2009;32:74–9.
48. Pedoto A, Caruso JE, Nandi J, Oler A, Hoffmann SP, Tassiopoulos AK, et al. Acidosis stimulates nitric oxide production and lung damage in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:397–402.
49. Pedoto A, Nandi J, Oler A, Camporesi EM, Hakim TS, Levine RA. Role of nitric oxide in acidosis-induced intestinal injury in anesthetized rats. *J Lab Clin Med*. 2001;138:270–6.
50. Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*. 2008;30:10–3.
51. Yaghi A, Paterson NA, McCormack DG. Vascular reactivity in sepsis: importance of controls and role of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:706–12.
52. Kahn AM, Cragoe Jr EJ, Allen JC, Halligan RD, Shelat H. Na(+)-H+ and Na(+)-dependent Cl(-)-HCO3(-) exchange control pHi in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1990;259:C134–43.
53. Little PJ, Neylon CB, Farrelly CA, Weissberg PL, Cragoe Jr EJ, Bobik A. Intracellular pH in vascular smooth muscle: regulation by sodium-hydrogen exchange and multiple sodium dependent HCO3(-) mechanisms. *Cardiovasc Res*. 1995;29:239–46.
54. Aalkjaer C, Peng HL. pH and smooth muscle. *Acta Physiol Scand*. 1997;161:557–66.
55. Boedtker E, Praetorius J, Aalkjaer C. NBCn1 (slc4a7) mediates the Na<sup>+</sup> –dependent bicarbonate transport important for regulation of intracellular pH in mouse vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2006;98:515–23.
56. Weil MH, Houle DB, Brown Jr EB, Campbell GS, Heath C. Vasopressor agents; influence of acidosis on cardiac and vascular responsiveness. *Calif Med*. 1958;88:437–40.
57. Bers DM, Ellis D. Intracellular calcium and sodium activity in sheep heart Purkinje fibres. Effect of changes of external sodium and intracellular pH. *Pflugers Arch*. 1982;393:171–8.
58. Allen DG, Orchard CH. The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol*. 1983;335:555–67.



59. Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1990;258:C967–81.
60. Kimmoun A, Ducrocq N, Sennoun N, Issa K, Strub C, Escanye JM, et al. Efficient extra- and intracellular alkalization improves cardiovascular functions in severe lactic acidosis induced by hemorrhagic shock. *Anesthesiology.* 2014;120:926–34.
61. Hagiya K, Takahashi H, Isaka Y, Inomata S, Tanaka M. Influence of acidosis on cardiotoxic effects of colforsin and epinephrine: a dose–response study. *J Cardiothorac Vasc Anesthesia.* 2013;27:925–32.
62. McCaul CL, McNamara P, Engelberts D, Slorach C, Hornberger LK, Kavanagh BP. The effect of global hypoxia on myocardial function after successful cardiopulmonary resuscitation in a laboratory model. *Resuscitation.* 2006;68:267–75.
63. Toller W, Wolkart G, Stranz C, Metzler H, Brunner F. Contractile action of levosimendan and epinephrine during acidosis. *Eur J Pharmacol.* 2005;507:199–209.
64. Chan PS, Kereiakes DJ, Bartone C, Chow T. Usefulness of microvolt T-wave alternans to predict outcomes in patients with ischemic cardiomyopathy beyond one year. *Am J Cardiol.* 2008;102:280–4.
65. Rosenbaum DS, Jackson LE, Smith JM, Garan H, Ruskin JN, Cohen RJ. Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *N Engl J Med.* 1994;330:235–41.
66. Austin C, Wray S. Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes. *J Physiol.* 1993;466:1–8.
67. Austin C, Wray S. Changes of intracellular pH in rat mesenteric vascular smooth muscle with high-K<sup>+</sup> depolarization. *J Physiol.* 1993;469:1–10.
68. Gardner JP, Dieck FP. Influence of pH on isometric force development and relaxation in skinned vascular smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1988;412:231–9.
69. Mitchell JH, Wildenthal K, Johnson Jr RL. The effects of acid–base disturbances on cardiovascular and pulmonary function. *Kidney Int.* 1972;1:375–89.
70. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2004–8.
71. Steenbergen C, Deleuw G, Rich T, Williamson JR. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res.* 1977;41:849–58.
72. Gabig TG, Bearman SI, Babior BM. Effects of oxygen tension and pH on the respiratory burst of human neutrophils. *Blood.* 1979;53:1133–9.
73. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005;67:124–33.
74. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1103–10.
75. Refsum HE, Opdahl H, Leraand S. Effect of extreme metabolic acidosis on oxygen delivery capacity of the blood - an in vitro investigation of changes in the oxyhemoglobin dissociation curve in blood with pH values of approximately 6.30. *Crit Care Med.* 1997;25:1497–501.
76. Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1992;311:53–72.
77. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen Jr C, Schaper J. Total ischemia III: effect of inhibition of anaerobic glycolysis. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:37–54.
78. Neumar RW, Otto CW, Link MS, Kronick SL, Shuster M, Callaway CW, et al. Part 8: adult advanced cardiovascular life support. 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010;122:S729–67.
79. Bollaert PE, Robin-Lherbier B, Mallie JP, Nace L, Escanye JM, Larcan A. Effects of sodium bicarbonate on striated muscle metabolism and intracellular pH during endotoxic shock. *Shock.* 1994;1:196–200.
80. Stacpoole PW. Lactic acidosis: the case against bicarbonate therapy. *Ann Intern Med.* 1986;105:276–9.
81. Wilson RF, Spencer AR, Tyburski JG, Dolman H, Zimmerman LH. Bicarbonate therapy in severely acidotic trauma patients increases mortality. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013;74:45–50. discussion 50.
82. Arief AI, Leach W, Park R, Lazarowitz VC. Systemic effects of NaHCO<sub>3</sub> in experimental lactic acidosis in dogs. *Am J Physiol.* 1982;242:F586–91.
83. Rhee KH, Toro LO, McDonald GG, Nunnally RL, Levin DL. Carbicarb, sodium bicarbonate, and sodium chloride in hypoxic lactic acidosis. Effect on arterial blood gases, lactate concentrations, hemodynamic variables, and myocardial intracellular pH. *Chest.* 1993;104:913–8.
84. Valenza F, Pizzocri M, Salice V, Chevillard G, Fossali T, Coppola S, et al. Sodium bicarbonate treatment during transient or sustained lactic acidemia in normoxic and normotensive rats. *PLoS One.* 2012;7:e46035.
85. Boyd JH, Walley KR. Is there a role for sodium bicarbonate in treating lactic acidosis from shock? *Curr Opin Crit Care.* 2008;14:379–83.
86. Lang RM, Fellner SK, Neumann A, Bushinsky DA, Borow KM. Left ventricular contractility varies directly with blood ionized calcium. *Ann Intern Med.* 1988;108:524–9.
87. Beech JS, Nolan KM, Illes RA, Cohen RD, Williams SC, Evans SJ. The effects of sodium bicarbonate and a mixture of sodium bicarbonate and carbonate (“Carbicarb”) on skeletal muscle pH and hemodynamic status in rats with hypovolemic shock. *Metabolism.* 1994;43:518–22.
88. Cooper DJ, Herbertson MJ, Werner HA, Walley KR. Bicarbonate does not increase left ventricular contractility during L-lactic acidemia in pigs. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:317–22.
89. Cooper DJ, Walley KR, Wiggs BR, Russell JA. Bicarbonate does not improve hemodynamics in critically ill patients who have lactic acidosis. A prospective, controlled clinical study. *Ann Intern Med.* 1990;112:492–8.
90. Graf H, Leach W, Arief AI. Evidence for a detrimental effect of bicarbonate therapy in hypoxic lactic acidosis. *Science.* 1985;227:754–6.
91. Iberti TJ, Kelly KM, Gentili DR, Rosen M, Katz DP, Premus G, et al. Effects of sodium bicarbonate in canine hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 1988;16:779–82.
92. Mathieu D, Neviere R, Billard V, Fleyfel M, Wattel F. Effects of bicarbonate therapy on hemodynamics and tissue oxygenation in patients with lactic acidosis: a prospective, controlled clinical study. *Crit Care Med.* 1991;19:1352–6.
93. Giunti C, Priouzeau F, Allemand D, Levraut J. Effect of tris-hydroxymethyl aminomethane on intracellular pH depends on the extracellular non-bicarbonate buffering capacity. *Transl Res.* 2007;150:350–6.
94. Moon PF, Gabor L, Gleed RD, Erb HN. Acid–base, metabolic, and hemodynamic effects of sodium bicarbonate or tromethamine administration in anesthetized dogs with experimentally induced metabolic acidosis. *Am J Vet Res.* 1997;58:771–6.
95. Sirieix D, Delayance S, Paris M, Massonnet-Castel S, Carpentier A, Baron JF. Tris-hydroxymethyl aminomethane and sodium bicarbonate to buffer metabolic acidosis in an isolated heart model. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:957–63.
96. Hoste EA, Colpaert K, Vanholder RC, Lameire NH, De Waele JJ, Blot SI, et al. Sodium bicarbonate versus THAM in ICU patients with mild metabolic acidosis. *J Nephrol.* 2005;18:303–7.
97. Adrogue HJ, Madias NE. Management of life-threatening acid–base disorders. First of two parts. *N Engl J Med.* 1998;338:26–34.
98. Sonett J, Baker LS, Hsi C, Knox MA, Visner MS, Landow L. Sodium bicarbonate versus Carbicarb in canine myocardial hypercarbic acidosis. *J Crit Care.* 1993;8:1–11.
99. Bersin RM, Arief AI. Improved hemodynamic function during hypoxia with Carbicarb, a new agent for the management of acidosis. *Circulation.* 1988;77:227–33.
100. Leung JM, Landow L, Franks M, Soja-Strzepa D, Heard SO, Arief AI, et al. Safety and efficacy of intravenous Carbicarb in patients undergoing surgery: comparison with sodium bicarbonate in the treatment of mild metabolic acidosis. SPI Research Group. Study of Perioperative Ischemia. *Crit Care Med.* 1994;22:1540–9.
101. Uchino S, Bellomo R, Ronco C. Intermittent versus continuous renal replacement therapy in the ICU: impact on electrolyte and acid–base balance. *Intensive Care Med.* 2001;27:1037–43.
102. Tan HK, Uchino S, Bellomo R. The acid–base effects of continuous hemofiltration with lactate or bicarbonate buffered replacement fluids. *Int J Artificial Organs.* 2003;26:477–83.
103. Naka T, Bellomo R. Bench-to-bedside review: treating acid–base abnormalities in the intensive care unit - the role of renal replacement therapy. *Crit Care.* 2004;8:108–14.
104. Investigators RRTS, Bellomo R, Cass A, Cole L, Finfer S, Gallagher M, et al. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009;361:1627–38.
105. Bellomo R, Lipcsey M, Calzavacca P, Haase M, Haase-Fielitz A, Licari E, et al. Early acid–base and blood pressure effects of continuous renal replacement therapy intensity in patients with metabolic acidosis. *Intensive Care Med.* 2013;39:429–36.

106. Cole L, Bellomo R, Journois D, Davenport P, Baldwin I, Tipping P. High-volume haemofiltration in human septic shock. *Intensive Care Med.* 2001;27:978–86.
107. Klouche K, Cavadore P, Portales P, Clot J, Canaud B, Beraud JJ. Continuous veno-venous hemofiltration improves hemodynamics in septic shock with acute renal failure without modifying TNF $\alpha$  and IL6 plasma concentrations. *J Nephrol.* 2002;15:150–7.
108. Ratanarat R, Brendolan A, Piccinni P, Dan M, Salvatori G, Ricci Z, et al. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. *Crit Care.* 2005;9:R294–302.
109. Tani M, Neely JR. Na<sup>+</sup> accumulation increases Ca<sup>2+</sup> overload and impairs function in anoxic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22:57–72.
110. Wu D, Kraut JA, Abraham WM. Sabiporide improves cardiovascular function, decreases the inflammatory response and reduces mortality in acute metabolic acidosis in pigs. *PLoS One.* 2013;8:e53932.
111. Lin X, Lee D, Wu D. Sabiporide improves cardiovascular function and attenuates organ injury from severe sepsis. *J Surg Res.* 2014;188:231–7.
112. Kim HJ, Son YK, An WS. Effect of sodium bicarbonate administration on mortality in patients with lactic acidosis: a retrospective analysis. *PLoS One.* 2013;8:e65283.
113. Levraut J, Garcia P, Giunti C, Ichai C, Bouregba M, Ciebiera JP, et al. The increase in CO<sub>2</sub> production induced by NaHCO<sub>3</sub> depends on blood albumin and hemoglobin concentrations. *Intensive Care Med.* 2000;26:558–64.
114. Nielsen HB, Bredmose PP, Stromstad M, Volianitis S, Quistorff B, Secher NH. Bicarbonate attenuates arterial desaturation during maximal exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93:724–31.
115. Nakashima K, Yamashita T, Kashiwagi S, Nakayama N, Kitahara T, Ito H. The effect of sodium bicarbonate on CBF and intracellular pH in man: stable Xe-CT and 31P-MRS. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1996;166:96–8.
116. Mark NH, Leung JM, Arieff AI, Mangano DT. Safety of low-dose intraoperative bicarbonate therapy: a prospective, double-blind, randomized study. The Study of Perioperative Ischemia (SPI) Research Group. *Crit Care Med.* 1993;21:659–65.
117. Fanconi S, Burger R, Ghelfi D, Uehlinger J, Arbenz U. Hemodynamic effects of sodium bicarbonate in critically ill neonates. *Intensive Care Med.* 1993;19:65–9.
118. Bersin RM, Chatterjee K, Arieff AI. Metabolic and hemodynamic consequences of sodium bicarbonate administration in patients with heart disease. *Am J Med.* 1989;87:7–14.
119. Shapiro JL, Whalen M, Chan L. Hemodynamic and hepatic pH responses to sodium bicarbonate and Carbicarb during systemic acidosis. *Magn Reson Med.* 1990;16:403–10.
120. Dimlich RV, Biros MH, Widman DW, Kaplan J. Comparison of sodium bicarbonate with dichloroacetate treatment of hyperlactatemia and lactic acidosis in the ischemic rat. *Resuscitation.* 1988;16:13–30.
121. Hope PL, Cady EB, Delpy DT, Ives NK, Gardiner RM, Reynolds EO. Brain metabolism and intracellular pH during ischaemia: effects of systemic glucose and bicarbonate administration studied by 31P and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo in the lamb. *J Neurochem.* 1988;50:1394–402.
122. Sessler D, Mills P, Gregory G, Litt L, James T. Effects of bicarbonate on arterial and brain intracellular pH in neonatal rabbits recovering from hypoxic lactic acidosis. *J Pediatr.* 1987;111:817–23.
123. Graf H, Leach W, Arieff AI. Metabolic effects of sodium bicarbonate in hypoxic lactic acidosis in dogs. *Am J Physiol.* 1985;249:F630–5.

**Annexe 4 : Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock**

# Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock

Antoine Kimmoun, Nicolas Ducrocq and Bruno Levy\*

*Service de Réanimation Médicale Brabois, CHU de Nancy – Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux, Rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre cedex ; Groupe CHOC, Equipe Avenir INSERM U961 Université de Lorraine, Faculté de médecine de Nancy, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France*

**Abstract:** *Purpose:* To define some of the most common characteristics of vascular hyporesponsiveness to catecholamines during septic shock and outline current therapeutic approaches and future perspectives.

*Methods:* Source data were obtained from a PubMed search of the medical literature with the following MeSH terms: Muscle, smooth, vascular/physiopathology; hypotension/etiology; shock/physiopathology; vasodilation/physiology; shock/therapy; vasoconstrictor agents.

*Results:* NO and peroxynitrite are mainly responsible for vasoplegia and vascular hyporeactivity while COX 2 enzyme is responsible for the increase in PGI<sub>2</sub>, which also contributes to hyporeactivity. Moreover, K<sup>+</sup>ATP and BKCa channels are over-activated during septic shock and participate in hypotension. Finally, other mechanisms are involved in vascular hyporesponsiveness such as critical illness-related corticosteroid insufficiency, vasopressin depletion, dysfunction and desensitization of adrenoreceptors as well as inactivation of catecholamines by oxidation.

*Conclusion:* In animal models, several therapeutic approaches, targeted on one particular compound have proven their efficacy in preventing or reversing vascular hyporesponsiveness to catecholamines. Unfortunately, none have been successfully tested in clinical trials. Nevertheless, very high doses of catecholamines (>5 µg/kg/min), hydrocortisone, terlipressin or vasopressin could represent an alternative for the treatment of refractory septic shock.

**Keywords:** Septic shock, vasopressor, nitric oxide, potassium channels, catecholamine.

## INTRODUCTION

Septic shock represents an important issue for intensivists with an increasing incidence rate for ICU admission between 5% and 19% [1]. Despite international guidelines for its management, septic shock remains the primary cause of death in ICU [2, 3]. Thus, vasopressor-refractory hypotension during septic shock is the last stage before death. In septic shock, hemodynamic injuries include cardiac and vascular impairment. This vascular dysfunction is characterized by microvascular and endothelial dysfunction but also by decreased vascular tone [4]. Vasoactive drugs are the main treatment to counteract low vascular tone and for restoring hemodynamic stability during septic shock. Intractable hypotension resulting in multi-organ injury can ultimately lead to patient death. In this latter case, vascular hyporesponsiveness to vasoactive drugs affects not only catecholamines but also vasopressin, angiotensin II and/or serotonin [5]. In this review, we present the most common characteristics of vascular hyporesponsiveness to vasopressors during septic shock and in particular those bearing clinical relevance. A brief outline of current therapeutic strategies and future approaches are also presented underlining the needed link

between fundamental and clinical research in order to improve the prognosis of refractory shock.

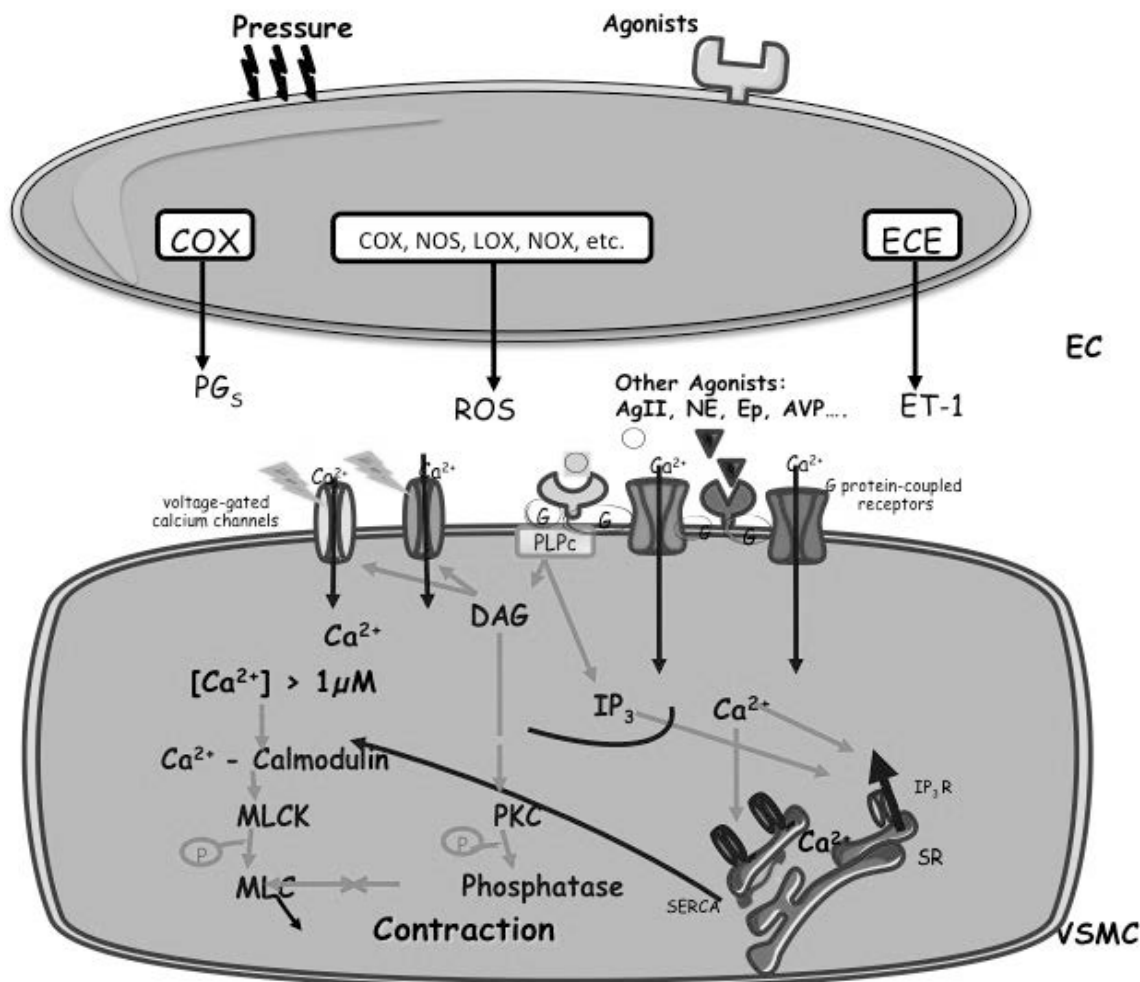
## PHYSIOLOGY OF VESSEL CONTRACTION AND RELAXATION

Constriction of vascular smooth muscle cells (VSMCs) involves two synergistic processes leading to intracellular calcium mobilization. In contrast, VSMCs relaxation is based on the decrease in cytoplasmic calcium concentration.

On the one hand, the increase in intracellular calcium is the result of hormonal and neural activation by ligands such as norepinephrine or angiotensin II. These ligands activate an enzymatic cascade reaction involving phospholipase C *via* specific G protein-coupled receptors on VSMCs. At the end of the reaction, the sarcoplasmic reticulum releases calcium after activation of the ryanodine receptor channel complex and inositol -3 phosphate (IP<sub>3</sub>) receptor by IP<sub>3</sub> and calcium itself. Secondly, the increase in intracytoplasmic calcium can also be generated by a change in membrane potential. The normal membrane potential of smooth muscle cells varies between -45 and -70 mV. A depolarization of the membrane, to a potential approaching 0 mV, induces the opening of voltage-gated calcium channels and thus the influx of extracellular calcium into the VSMC (Fig. 1).

A decrease in intracellular calcium allows VSMC relaxation secondary to calcium reuptake by SR and expulsion of

\*Address correspondence to this author at the Groupe CHOC, Equipe Avenir INSERM U961 Université de Lorraine, Faculté de médecine de Nancy, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France; Tel: 0033383153294; Fax: 0033383154220; E-mail: b.levy@chu-nancy.fr



**Fig. (1).** Mechanisms of vascular contraction.

Under certain conditions, the endothelial cells, when activated by neurohumoral mediators or subjected to pressure, release a vasoconstrictor substance which diffuses to the underlying vascular smooth muscle and initiates its contraction. *EC* endothelial cell, *VSMC* vascular smooth muscle cell, *COX* cyclooxygenase, *LOX* lipoxygenase, *NOX* NADPH oxidase, *NOS* nitric oxide synthase, *ECE* endothelin-converting enzyme, *PGs* prostaglandins, *ROS* reactive oxygen species, *ET-1* endothelin-1, *Ag II* angiotensin II, *NE* norepinephrine, *Ep* epinephrine, *PLPc* phospholipase C, *DAG* diacylglycerol, *IP<sub>3</sub>* inositol trisphosphate, *PKC* protein kinase C, *IP<sub>3</sub>R* inositol-1,4,5-trisphosphate-receptor, *PKC* protein kinase C, *MLCK* myosin light-chain kinase, *SERCA* sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{++}$ -ATPases.

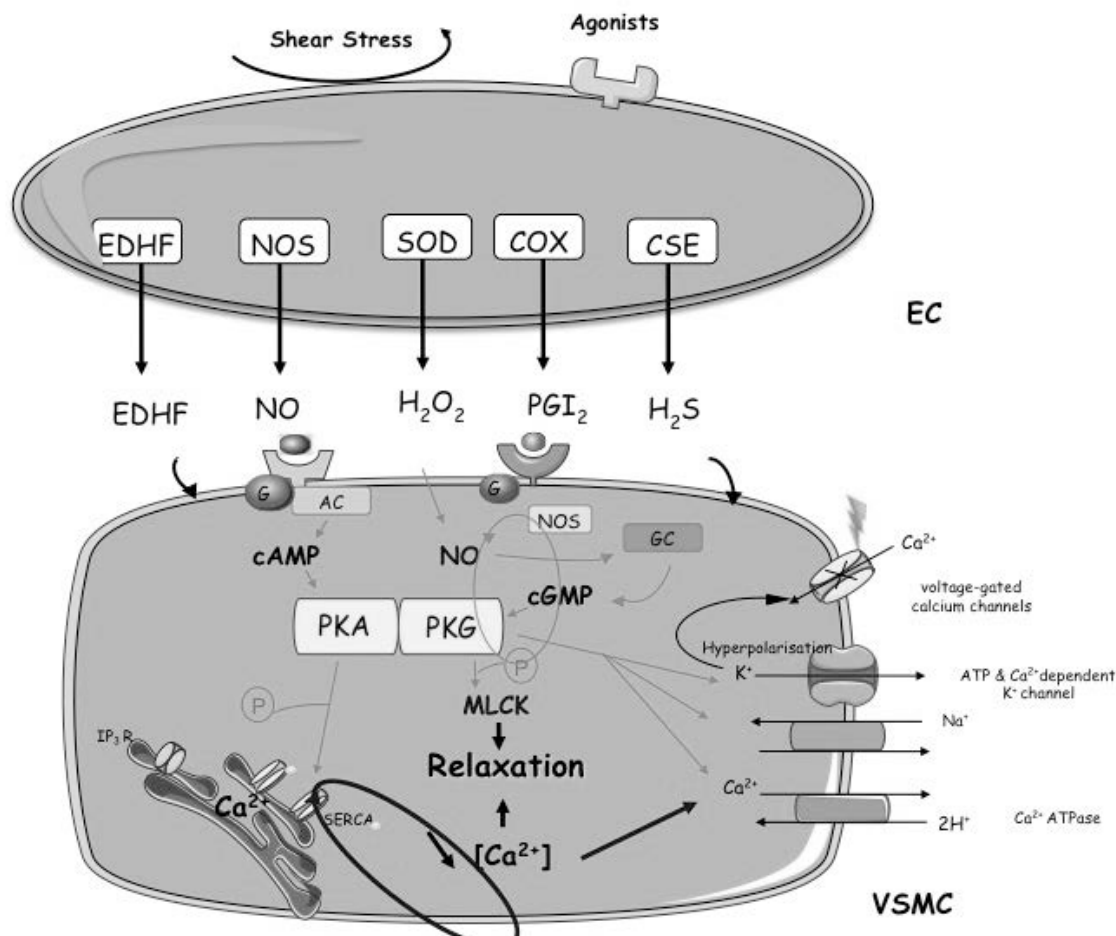
calcium to the extracellular space. Many vasodilator agents are involved in this process such as acetylcholine, nitric oxide, atrial natriuretic peptide, histamine and serotonin, all of which act through activation of the guanylate and adenylyl cyclase signaling pathways leading to an increase in cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate (Fig. 2).

#### HOW TO DEFINE VASCULAR HYPORESPONSIVENESS?

Currently, there is no clear published definition of vascular hyporesponsiveness. We suggest that the inability to increase arterial pressure despite high vasopressor infusion in septic shock patients is the clinical definition of vascular hyporesponsiveness [6]. Thus, vascular hypovasoreactivity is the failure of vascular smooth muscle constriction to sustain sufficient blood pressure. Experimentally, hypovasoreactivity can be observed in myography chambers by exposing segments of isolated vessels to phenylephrine, a pure alpha

agonist. Dose-response curves to phenylephrine allow detection of vascular hyporesponsiveness defined by a lower developed force to vasopressor compared to healthy vessels. In clinical practice, dose-response curves can also be obtained. In this instance, a lower increase in arterial pressure in patients for a same dose of vasopressor agent compared to healthy patients defines hypovasoreactivity [7]. However, in humans, there are many additional mechanisms involved in arterial pressure regulation such as catecholamines, vasopressin, angiotensin II, serotonin, cardiac adaptation and the baroreflex. Conversely, NO and prostaglandins are regulatory mechanisms preventing excessively high blood pressure values.

Hypotension associated with vascular hyporeactivity is a significant and independent prognostic factor of mortality [8]. At bedside, the total amount of infused vasopressors to maintain mean arterial pressure reflects hypovasoreactivity whereas lower diastolic blood pressure reflects the degree of vasoplegia [9, 10].



**Fig. (2).** Endothelium-dependent relaxation.

Multiplicity of mechanisms leading to endothelium relaxation such as shear stress and vasorelaxant agonists; ECs synthesize and release various vasorelaxation factors that can diffuse toward the VSMCs and produce relaxation. *EC* endothelial cell, *VSMC* vascular smooth muscle cell, *EDHF* endothelium-derived hyperpolarizing factor, *NOS* nitric oxide synthase, *SOD* superoxide dismutases, *COX* cyclooxygenase, *CSE* cystathionine  $\gamma$ -lyase, *NO* nitric oxide, *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* hydrogen peroxide, *PGI<sub>2</sub>* prostacyclin, *H<sub>2</sub>S* hydrogen sulfide; *G* protein G, *AC* adenylyl cyclase, *NO* nitric oxide, *GC* guanylate cyclase, *cAMP* cyclic adenosine monophosphate, *cGMP* cyclic guanosine monophosphate, *PKA* protein kinase A, *PKG* protein kinase G, *MLCK* myosin light-chain kinase, *SERCA* sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{++}$ -ATPases, *ATP* adenosine triphosphate, *IP<sub>3</sub>R* inositol-1,4,5-trisphosphate-receptor, *P* phosphate.

## DOES VASCULAR HYPORESPONSIVENESS EXIST IN SEPTIC SHOCK?

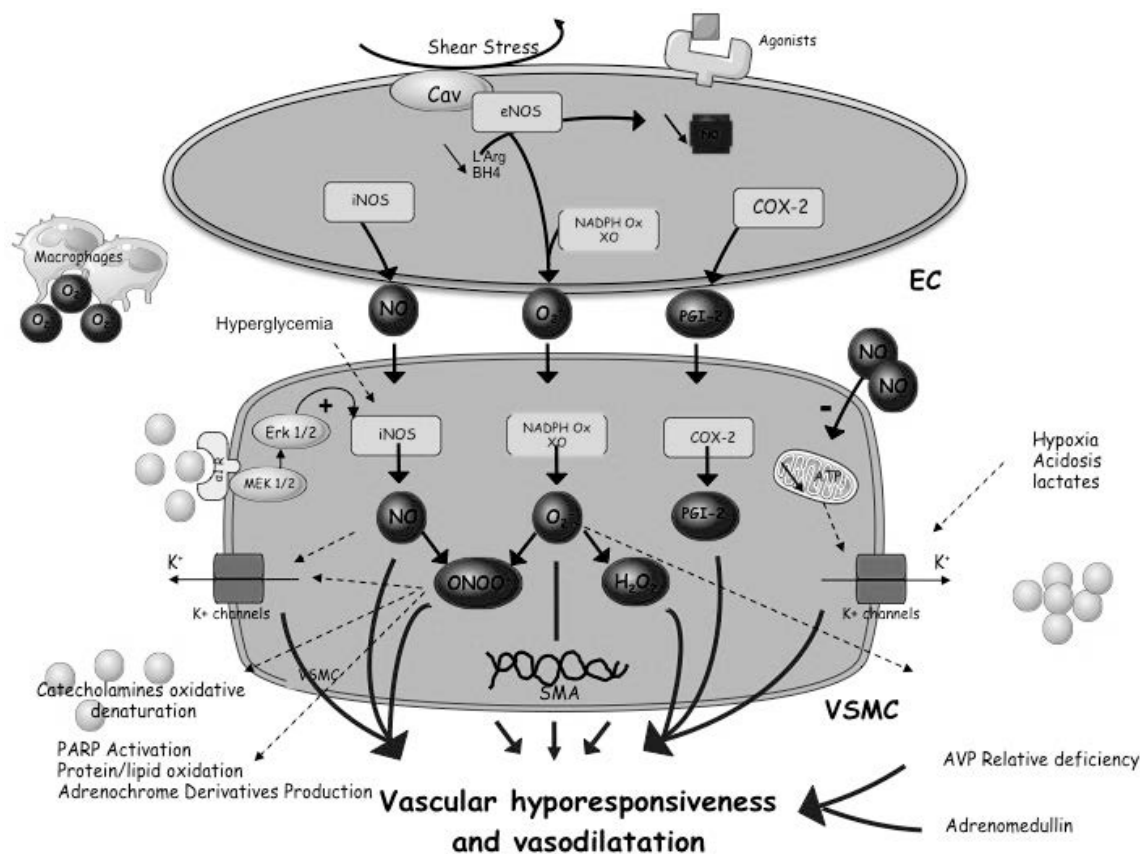
There is ample clinical evidence of vascular hyporesponsiveness to vasopressors during septic shock. In the early stages of septic shock, a higher level of endogenous norepinephrine is found in non-survivors compared to survivors in addition to demonstrating poor vasoreactivity [11]. Moreover, in a study assessing vasoreactivity on dose-response curves to incremental doses of phenylephrine in twenty septic shock patients compared to twelve healthy patients, Bellissant *et al.* confirmed a decreased response to alpha-adrenergic agonist during septic shock [7].

Further clinical evidence of this vascular hyporesponsiveness in septic shock resides in the fact that volume-resuscitated septic shock patients remain hypotensive despite elevated levels of endogenous and exogenous catecholamines and maximal activation of the renin-angiotensin system.

## MECHANISMS INVOLVED IN VASCULAR DYSFUNCTION/HYPORESPONSIVENESS (FIG. 3).

### Nitric oxide (NO)

NO is produced in picomolar concentration from L-arginine in endothelial cells by cNOS, a constitutive isoform of Nitric Oxide Synthase. However, inflammation and sepsis lead to the expression of iNOS, an inducible NOS, in vessel wall and smooth muscle with a 1000-fold increase in NO production. Moreover, a mitochondrial source of NO (mtNOS) has recently been reported in certain studies and may represent a significant source of the molecule [12]. NO has many roles, including participation in the regulation of blood flow, coagulation, neural activity and immune functions. NO diffuses through the endothelium to VSMC cytoplasm and subsequently induces vasorelaxation. VSMCs can also inherently produce NO by iNOS activation. In fact, inhibition of Rho protein (small GTP-binding proteins of the Ras superfamily playing a major role in the IL-1



**Fig. (3).** Mechanisms of vascular dysfunction in sepsis.

When the infectious agent invades the bloodstream, systemic activation of inflammation leads to cytokine release and endothelial activation and dysfunction. Multiple cascades of intracellular signaling reactions are initiated and induce vascular hyporesponsiveness and vasodilatation. A functional impairment of ECs and VSMCs contributes to endothelial and vascular dysfunction. Both cells synthesize and release various oxidative stress and vasodilatation factors, which subsequently react with many products, receptors, and channels to induce their oxidation. *EC* endothelial cell, *VSMC* vascular smooth muscle cell, *eNOS* endothelial nitric oxide synthase, *BH4* 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine, *L-Arg* L-arginine, *iNOS* inducible nitric oxide synthase, *COX-2* cyclooxygenase-2, *NADPH Ox* oxy nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, *XO* xanthine oxidase  $O_2^-$  superoxide anions, *PGI-2* prostacyclin, *NO* nitric oxide, *ONOO<sup>-</sup>* peroxynitrite,  $H_2O_2$  hydrogen peroxide, *Erk* extracellular signal-regulated kinases, *MEK 1/2* mitogen-activated protein kinase kinases 1/2, *Erk 1/2* extracellular signal-regulated kinases 1/2, *AVP* arginine vasopressin.

$\beta$ -dependent signaling pathway) by mevastatin was shown to produce significantly higher amounts of evoked NO and iNOS protein compared with control [13]. In VSMC, NO activates a signal transduction mechanism with production of cGMP by soluble guanylate cyclase.

Vasodilator effects of NO have been widely studied *ex vivo* and *in vivo*. For example, the pressor response to norepinephrine was found to be deeply altered in isolated vessels from endotoxemic rats. In contrast, in presence of NOS inhibitors such as NG-monomethyl-L-arginine (LNMMA) or methylene blue, norepinephrine response was completely restored independently of the presence or absence of endothelium. This endothelium-independent VSMC NO production (iNOS) was therefore strongly suggested during sepsis, explaining the profound vasoplegia and limited response to stimuli that normally regulate blood flow and tissue perfusion [14]. iNOS implication in hypovasoactivity during endotoxin stimulation by LPS has also been clearly established in iNOS knock-out mice [15].

Given its vasodilator effects during septic shock, inhibition of NO has become an ongoing challenge since the mid-1990s. NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-

mid-1990s. NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) is the most non-specific NOS inhibitor studied. In an animal LPS model, L-NAME was found to restore main arterial pressure to normal values and to increase vascular systemic resistances by twofold [16]. However, several other studies reported a decrease in cardiac output possibly linked to high right ventricular afterload as a result of increased pulmonary vascular resistance or direct myocardial injury [17-19]. Moreover, despite hemodynamic restoration under L-NAME, this treatment failed to improve survival in an animal model of endotoxemia [20]. Unfortunately, a phase III study assessing the effectiveness of a nonselective NOS inhibitor (N<sup>G</sup> methyl-

L-arginine hydrochloride; L-NMMA) during septic shock showed an increase in overall mortality in the treated group and was prematurely halted [21]. Nevertheless, the use of more selective inhibitors of iNOS such as S-methylisothiouria, L-canavanine and aminoguanidine has been experimentally tested with success [22]. However, none of these molecules have been tested in human clinical studies.

While NO has deleterious effects in pathological settings, many evidences sustain its fundamental physiological role. Blocking the production of NO can lead to serious negative effects [23] such as:

- 1) Altered microcirculatory flow
- 2) A decrease in NO-dependent bactericidal activity
- 3) A decrease in neutralizing activity of oxygen-derived species
- 4) A decrease in the modulation of blood coagulation
- 5) An increase in oxygen demand by improving mitochondrial respiration in tissues in which perfusion, and hence oxygen delivery, remains precarious, thereby exacerbating the oxygen supply/demand balance

The current paradigm in which NO must necessarily have adverse side effects during septic shock may be challenged. A recent study demonstrated that nitrite therapy in an endotoxemic model of septic shock prevents tissue damage, organ failure and mortality in a soluble guanylate cyclase-dependent manner [24].

In summary, excessive NO production during septic shock is a central component of vascular hyporesponsiveness. Nevertheless, its complete blockade by a NOS inhibitor does not constitute an effective therapy and furthermore increases mortality.

### Prostacyclin and COX-2 Pathways

Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) is a lipid mediator, belonging to the prostaglandin family. It is the main product of arachidonic acid metabolism produced in the endothelium by action of the enzymes cyclooxygenase (COX) and prostacyclin synthase (PGIS). PGI<sub>2</sub> has potent antithrombotic and vasodilator effects and acts through the G<sub>s</sub> protein-coupled receptor (IP) located on VSMCs [25]. Vasorelaxant effects on VSMCs are mediated through cAMP after stimulation of IP by PGI<sub>2</sub>. Under vasoplegic conditions (patients under septic shock and in animals treated with LPS or proinflammatory cytokines), PGI<sub>2</sub> is up-regulated and contributes to vascular hyporeactivity [26]. Similarly to NO regulation, an inducible isoform of COX, the COX-2 enzyme, is mainly responsible for the increase in PGI<sub>2</sub> in VSMCs [27]. Use of a COX-2 blocker in an animal model of endotoxemic shock has been shown to restore systemic arterial pressure [28]. Inhibition of IP attenuates LPS-induced hypotension without change in NO or cytokine levels whereas activation of the PGI<sub>2</sub>/IP system most likely has a specific vasodilator effect in vascular failure during septic shock [29]. However, in a recent study, knock-out mice for COX-2 did not prevent LPS induced hypotension, thus suggesting that COX-2 may not be essential for vascular reactivity [30]. Furthermore, in a clinical trial, non-specific inhibition of prostaglandin synthesis by ibuprofen during septic shock was non-conclusive in decreasing mortality [31].

### Free Radicals: the Peroxynitrite Ion and Superoxide Anion

Free radicals are a group of highly unstable molecules, generated via incomplete reduction of molecular oxygen,

which have one or more unpaired electrons in their outer orbital. Superoxide anion and hydroxyl radicals are the most commonly found reactive species derived from oxygen. Functions of these free radicals are essential, including during growth and cell differentiation. Similarly, reactive nitrogen species such as peroxynitrite, derived from NO metabolism in physiological conditions, are important contributors to key cellular functions. Thus, when NO collides with superoxide anions, peroxynitrite, nitrite and nitrate are spontaneously formed, all in the absence of enzymatic reaction. Hence, much of the biological effects of NO have been suggested to be rather due to peroxynitrite [32].

However, overproduction during an “oxidative stress” can induce organ injury and more specifically endothelial dysfunction and hypovasoactivity. During severe sepsis and septic shock, there is an increased formation of NO and superoxide leading to production of large quantities of peroxynitrite. Superoxide production stems from i) reactions catalyzed from NADPH oxidase present in leukocytes and endothelial cells, ii) the conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase, iii) the partial reduction of molecular oxygen within mitochondria and finally iv) the uncoupling of NOS in conditions of L-arginine or tetrahydrobiopterin deficiency [32].

Peroxynitrite production has been confirmed *in vivo* in an animal endotoxemic model with an increase in nitrotyrosine (a nonspecific marker of nitrating species) in thoracic aorta, which was prevented by inhibiting the activity of NOS with NG-methyl-L-arginine *in vivo* [33]. Furthermore, hypovasoactivity was reversed by the use of an inhibitor of peroxynitrite formation or by the genetic suppression of NADPH, which reduced the total amount of peroxynitrite. In the same manner, depletion of endogenous glutathione store increases peroxynitrite production and exacerbates hypovasoactivity. Peroxynitrite cytotoxicity is mediated through the activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), a critical enzyme implicated in DNA repair. In instances of over activation of this enzyme by peroxynitrite, the tricarboxylic acid cycle is depleted in NAD<sup>+</sup>, leading to a loss in ATP and cell death [34].

Superoxide anion is also involved in vascular hyporeactivity. Indeed, numerous *in vitro* studies have well established that catecholamines are autoxidized by superoxide anion [35]. MacArthur *et al.*, in an experimental model of septic shock, confirmed *in vivo* that hyporeactivity during septic shock is due in part to deactivation of catecholamines by superoxide anion. Moreover, in this same model, administration of M40403, a synthetic and superoxide-selective low molecular weight mimetic of superoxide dismutase (SOD), completely restored arterial pressure as well as vasoreactivity [36].

Despite these promising experimental results, there is no current clinical trial assessing the effects of peroxynitrite inhibition. Nevertheless, certain preliminary studies suggest that antioxidant therapy such as vitamin C may restore vascular reactivity caused by *E. coli* endotoxemia [37, 38].

### ATP-sensitive Potassium Channels

Under normal conditions, channel opening induces loss of K<sup>+</sup> from the cell resulting in membrane repolarization.



Excessive activation of K<sup>+</sup> channels on VSMC membranes leads to hyperpolarization and inhibition of voltage-sensitive calcium channels, inducing cell relaxation, vasodilation, and ultimately leading to hypotension and vascular hyporeactivity. There are various pathological situations where K<sup>+</sup> channels are over-activated. Hypoxia, acidosis, hyperlactatemia, NO and peroxynitrite all activate K<sup>+</sup> ATP channels, inducing membrane hyperpolarization leading to vasorelaxation.

Landry and Olivier first demonstrated the implication of K<sup>+</sup> ATP channels in the pathophysiology of hypovasoactivity during septic shock. In an experimental model of endotoxemic shock and hypoxic lactic acidosis, the injection of glibenclamide (a non-specific sulfonylurea inhibitor of K<sup>+</sup> ATP channels) restored arterial pressure as well as responsiveness to catecholamines [36]. Several others studies have since confirmed these results [39].

In a recent study on vascular K<sup>+</sup> ATP regulation during septic shock, vascular K<sup>+</sup> ATP but not BKCa channels were found to be activated, over-expressed and partially regulated by NO via NFκB activation during septic shock [40]. Their selective inhibition, on the other hand, was able to restore vascular responsiveness, thus offering new therapeutic perspectives.

Two clinical trials have studied the effects of glibenclamide *versus* placebo during septic shock. Unfortunately, glibenclamide was found to have no effect on arterial pressure restoration or on vasoconstrictor dose requirements [41, 42].

Targeting K<sup>+</sup> ATP channels thus appears to be a complex process, given their ubiquitous distribution and the risks of unexpected side effects in using non-specific inhibitors.

### **Involvement of BKCa Channels**

Large conductance calcium-activated potassium (BKCa) channels are the most widespread of vascular K<sup>+</sup> channels. During depolarization, high levels of intracellular calcium activate BKCa channels, which in turn induce hyperpolarization and contribute to the initiation of VSMC relaxation. The mechanisms involved in BKCa modulation during shock states include NO and reactive species such as peroxynitrite or superoxide anion. Experimentally, inhibitors of soluble guanylate cyclase (methylene blue) or specific inhibitors of BKCa (iberiotoxin) protect against LPS-induced vasoplegia [43]. However, Collin *et al.* failed to find any *in vivo* hemodynamic effects following inhibition of BKCa by iberiotoxin [43]. Once again, however, there are no corresponding clinical data.

### **Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency (CIRCI)**

CIRCI is currently considered the best term to describe the discrepancy between cellular corticosteroid activity and severity of patient illness. CIRCI is characterized by (1) adrenal insufficiency, (2) tissue resistance to glucocorticoids and (3) excessive proinflammatory response [44]. Glucocorticoids and mineralocorticoids have been known for many years to improve the vasoconstrictor response to epinephrine [35]. Moreover, cortisol inhibition by RU486 specifically alters vascular tone and responsiveness to vasoconstrictors with no effect on cardiac output [45].

However, the underlying mechanisms remain complex and may involve different pathways such as iNOS and COX-2 inhibition or stimulation of phosphoinositide. In healthy male subjects, short-term infusion of hydrocortisone does not alter early nitrite nitrate levels after acetylcholine-induced vasodilation. Thus, early corticosteroid effects on hemodynamics (<3h) are not mediated by NO inhibition [46]. However, inhibition of NFκB remains the most suitable hypothesis for late glucocorticoid effects on hemodynamics (>3h) [47]. Furthermore, by decreasing the expression of NFκB, corticosteroids also decrease the production of NO via iNOS. The detailed mechanisms of action of corticosteroids involve genomic as well as non-genomic effects after activation of their nuclear receptor [48]. Results for COX-2 inhibition are inconclusive however. For example, in an endotoxemic rat model, hemodynamic improvement could not be attributed to COX-2 inhibition by dexamethasone [49]. In aortic VSMCs *in vitro*, cortisol increased inositol-1,4,5-triphosphate concentration as well as calcium release from the sarcoplasmic reticulum [50]. This increase was more pronounced in hypertensive rats compared to normotensive controls.

The use of glucocorticoids during septic shock is further discussed in the therapeutics section.

### **Modifications of Catecholamine Signaling**

Catecholamine signaling and its regulation during sepsis have been investigated in greater depth with regard to myocardial β adrenoreceptors than for vascular α adrenoreceptors. Nevertheless, in septic shock, during the early myocardial hyperkinetic phase, α1 adrenoreceptors are externalized from light vesicles to the sarcolemma whereas they are internalized from membrane surfaces to the cytoplasm during the late myocardial hypokinetic phase [51]. Several experimental studies have shown that α adrenoreceptor activity is attenuated during sepsis [52, 53]. For example, during sepsis, the number of adrenoreceptors in human liver undergoes dynamic changes: they increase in mild sepsis, return to normal in moderate sepsis but decrease in severe sepsis [54]. These results may be partly explained by peroxynitrite, which decreases the number of α1a- and α1d- adrenoreceptors without altering their affinities. Conversely, peroxynitrite inhibits the increase in intracellular calcium normally stimulated by norepinephrine [55].

Finally, β blockade during septic shock, by decreasing sepsis-induced inflammation, may improve vascular reactivity and could represent an interesting new therapeutic target for septic shock. However, as above, there are still no current human data [56].

### **Hyperglycemia and Insulin**

Hyperglycemia and insulin resistance are classic phenomena during septic shock. Moreover, hyperglycemia is associated with poor outcome whereas its normalization by strict insulin therapy improves mortality [57].

In healthy rats, hyperglycemia induces iNOS expression, which increases NO production by activation of protein kinase C beta II [58]. Glycemic control can also modulate regional NO production. In instances of hyperglycemia and

high insulin level, increased NO production is associated with low NO substrate (arginine). High endogenous NO inhibitor levels (asymmetric dimethylarginine; ADMA) are also found in critically ill patients with hyperglycemia and who are at risk of multiple organ failure. In addition, in an animal critical-illness model of burn injury (third-degree burn injury covering 20% total body surface area) with endogenous insulin deficiency (induced by alloxan), control of glycemia by means of a strict insulin protocol enabled to maintain normal ADMA levels [59].

Intensive glucose control (0.8 g/l – 1.1 g/l) increases mortality among adult ICU patients while a conventional glucose target (<1.8 g/l) results in lower mortality [60]. Nevertheless, intensive insulin therapy failed to improve in-hospital mortality in patients treated with hydrocortisone for septic shock [61].

### Vasodilation is Heterogeneous

Exploring vasoreactivity in shock state and more specifically during sepsis represents a daunting challenge. Depending on the vessel under investigation, the vasoconstrictor response varies. Vascular architecture is usually divided into two systems. Large arteries such as aorta carry blood to organs and are conductance arteries. Small arteries such as third order mesenteric arteries adjust blood flow in tissues and are resistance arteries.

However, much of the experimental studies investigating vasoreactivity have used *in vitro* myography of aortic rings to build dose-response curves to explore constriction as well as relaxation. Hence, sustained peripheral resistance and tissue perfusions with vasopressors remain the main hemodynamic goal during shock state. Knowing that conductance arteries contribute little to maintain peripheral resistances, interpretation of these experimental studies must be made with caution. For example, in septic aortic vessels, while experimental data usually revealed deep hyporesponsiveness to vasopressors, Stoclet *et al.* found that contractile responses of small omental arteries from septic patients were not significantly altered *ex vivo*. These results are certainly intriguing since these arteries were removed from severely vasoplegic patients. Moreover, adjunction of LNAME, an NOS inhibitor, or indomethacin, a COX 2 inhibitor, enhanced vasoconstrictive response to low doses of norepinephrine. Even if the underlying mechanism of this hyperreactivity is unknown, this unexpected result highlights the possible differences between conductance and resistance vessels [62]. However, assessing vasoreactivity of resistance arteries by myography remains difficult. Beyond their small size, manipulating these vessels without altering the endothelium is a complex process [63].

Clinicians must keep in mind that, during shock state, arterial pressure is measured *via* a conductive artery. Consequently, titrating norepinephrine on arterial pressure may be inadequate for restoring peripheral resistance without impairing tissue perfusion. This latter point is illustrated by the fact that infusion of nitroglycerin, a NO donor, in septic shock patients under vasopressor treatment, allows the enrollment of capillary arteries and improves microcirculation assessed by orthogonal spectral polarization imaging [64].

## THERAPEUTICS

### Catecholamines

Hemodynamic management of septic shock combines in a first instance an aggressive volume expansion and, when necessary, the early use of catecholamines. A recent meta-analysis from the Cochrane database assessed whether particular vasopressors reduce overall mortality and morbidity or improve health-related quality of life. The main findings of these 23 randomized controlled trials involving 3212 patients, including 1629 deceased patients, were that there is no difference in mortality between vasopressors used alone or in combination [65]. However, dopamine compared to norepinephrine is associated with much more arrhythmia and should be abandoned [66]. Nevertheless, the most recent guideline for the management of septic shock suggests that epinephrine should be only reserved in case of refractory shock [3]. In fact, epinephrine may be detrimental to regional circulation in addition to increasing blood lactate [67]. However, in a randomized, multicenter double-blind study, no difference was found in efficacy and safety between norepinephrine plus dobutamine and epinephrine [68].

It is generally acknowledged that vasopressors must be titrated to 65-70 mmHg of mean arterial pressure (MAP) [69]. In fact, the ideal MAP in patients with septic shock is unknown. Consequently, a randomized controlled study is currently underway in order to assess the effect of two levels of MAP on mortality in patients with septic shock (80-85 vs. 65-70 mmHg) (SEPSISPAM: NCT01149278). The pharmacodynamic effects of catecholamines are characterized by the existence of a concentration threshold at which the expected effect is observable (in the order of 100 pg/ml for adrenalin and 1,000 pg/ml for norepinephrine), followed by a linear increase in effect as a function of the logarithm of concentrations [70]. The maximum effect is usually achieved at doses ranging from 100 to 1,000 times the threshold dose, which largely surpasses the standard dosage range used in clinical practice. This type of dose-response curve explains why for threshold doses that differ by only 1 microg/kg/min from one patient to another, an identical pharmacodynamic effect on the dose-response curve will require dosages that differ by 10 microg/kg/min [71]. The obvious conclusion is therefore not to hesitate in transiently increasing the dosage of catecholamines if the patient is vasoplegic and hyperkinetic (although this remains experimental) or to use alternative therapies. In case of refractory shock, which is associated with dramatic prognosis, the use of methylene blue, vasopressin, high volume hemofiltration or plasmapheresis could eventually be considered [72-75].

### Vasopressin and Terlipressin for Catecholamine-resistant Septic Shock

Vasopressin (AVP), otherwise known as antidiuretic hormone, is a nonapeptide produced by the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. AVP is synthesized in response to hyperosmolarity and arterial hypotension. Under physiological conditions, vasopressin does not contribute to vascular tone but becomes critical when blood pressure is threatened. In septic shock, a low plasma vasopressin level is found as opposed to high levels in

cardiogenic shock. Two reasons could explain these observations: 1) an impaired baroreflex-mediated vasopressin secretion and 2) a massive depletion of the secretory store of the posterior pituitary gland [76]. These two hypotheses have been confirmed by Sharshar *et al.*, in septic shock patients in whom a decrease in baroreflex sensitivity and an absence of high signal intensity in the posterior lobe of the pituitary gland was observed on T1-weighted magnetic resonance images [77]. Vasopressin, by binding to its V1a or V1R receptor, located primarily on blood vessel smooth muscle cells, induces vasoconstriction. In a study assessing the efficacy of vasopressin compared to norepinephrine in septic shock patients, a low dose of vasopressin (<0.04UI/min) or norepinephrine was added to open-label vasopressor infusion in order to sustain a mean arterial pressure between 65-70 mmHg. Results revealed that there was no overall difference in mortality between groups at day 28. However, in post hoc analysis, in those patients with moderate septic shock defined by a low dose of norepinephrine infusion <15 microg/min, the vasopressin group displayed better survival at 28 days compared to the norepinephrine group [78].

Terlipressin is a prodrug peptide and vasopressin analog exhibiting greater activity for V1 receptors than V2 receptors (2.2 / 1 vs. 1 / 1 for arginine-vasopressin). Terlipressin also has a longer half-life: 50 min vs. 8 min for vasopressin, which allows for discontinuous administration every 4 hours [79]. Bolus administration of terlipressin is associated with several adverse effects in both experimental and clinical settings: reduction of cardiac index, coronary vasoconstriction and digital ischemia [75]. In order to avoid these adverse effects, it has been suggested to infuse terlipressin in a continuous manner or to administer lower boluses at shorter intervals [80]. Similar side effects have also been observed with vasopressin.

In clinical practice, vasopressin could eventually be used in refractory septic shock. However, despite its capacity to reverse a critical hemodynamic state, vasopressin is also potentially dangerous because of possible intense vasoconstriction especially if arterial pressure is too high or if the heart is impaired. Thus, it still remains unclear whether vasopressin or terlipressin should be preferred in the treatment of vasodilatory shock states unresponsive to conventional vasopressor agents.

### Activated Protein C

Recombinant activated protein C (APC) is an endogenous protein with several functions including inhibition of thrombosis and inflammation and promoting fibrinolysis. In septic shock, its conversion from an inactive to active state by thrombin coupled with thrombomodulin may be impaired. APC has been demonstrated to reduce the mortality rate of adult patients with septic shock. Data from the PROWESS study demonstrated that the use of APC was associated with a quicker reduction in cardiovascular failure [81]. Post-PROWESS investigative areas have been associated with a myriad of cellular studies demonstrating that APC, through reactions mediated by the endothelial protein C receptor (EPCR) and the effector receptor (protease activated receptor-1), acts directly on cells to exert multiple cytoprotective effects including: (a) downregulation of proinflammatory

gene expression, (b) anti-apoptotic activity, (c) antioxidant properties and (d) protection of endothelial barrier function [82-85]. In a clinical phase III trial, activated protein C has been shown to be efficient in reducing overall mortality. However, APC may be associated with an increased risk of bleeding [81]. APC efficacy and safety has been questioned ever since the FDA authorized its use almost 10 years ago. A new trial, the PROWESS SHOCK, was therefore conducted and the first results were publicly reported to the scientific community in October 2011: the 28-day all-cause mortality rate was 26.4% in patients treated with APC compared with 24.2% in the placebo group. There was no risk for severe bleeding events with APC compared to placebo (1% in APC vs. 1.2% in placebo group). Thus, the European Medicines Agency and the Food and Drug Administration announced that APC was being withdrawn from the market.

### Hydrocortisone

Low doses of corticosteroid are widely used as a replacement therapy in septic shock patients with relative adrenal insufficiency. In a first randomized study by Annane *et al.* involving septic shock patients who remained hypotensive after fluid and vasopressor resuscitation and were non-responders to the corticotropin test, low doses of hydrocortisone significantly reduced the risk of death at 28 days without increasing adverse events [86]. In contrast, a second randomized study by Sprung *et al.* found that hydrocortisone did not improve survival or reversal of shock in patients with septic shock, even for those who had a negative corticotropin test. However, hydrocortisone hastened the reversal of shock in patients in whom shock was ultimately reversed [87]. Beneficial effects of glucocorticoids have also been found in non-infectious shock states such as vascular failure in post-cardiac surgical patients [88]. Currently, both the Surviving Sepsis Campaign and the American College of Critical Care Medicine International Consensus recommend giving stress-dose steroid therapy only in septic shock after blood pressure is identified to be poorly responsive to fluid and vasopressor therapy (grade 2C) [3, 44].

### CONCLUSION

Vascular hyporesponsiveness harbors a complex pathophysiology involving several mechanisms and numerous cellular pathways. Despite a high level of knowledge, there is still no efficient and safe targeted therapy. Indeed, many of the therapeutic approaches that have proven their efficacy in animal models and especially therapies directed against a particular compound have failed when used in human shock. The most obvious conclusion is that preventing or decreasing the global cellular consequences of septic shock may prevent the overproduction of involved mediators. For example, manipulating innate immunity with a peptide derived from the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) has been shown to improve hemodynamics and mortality in various forms of shock [89]. Another example stems from the Rivers study, in which patients who benefited from a goal-directed therapeutic approach required less vasopressor therapy after 24 h of treatment, hence demonstrating that early treatment of vascular failure accompanied by sound commonsense practices (antibiotic therapy, monitoring) enables to reduce the impact of sepsis on vascular failure,

likely by reducing the consequences of tissue hypoperfusion [90]. This hypothesis is sustained by the markedly reduced mortality in the placebo group of septic shock studies such as in the PROWESS-SHOCK trial.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

### ACKNOWLEDGEMENT

Declared none.

### REFERENCES

- [1] Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, Group ES: EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004, 30:580-588.
- [2] 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(7):1303-1310.
- [3] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R *et al.*: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008, 36:296-327.
- [4] Matsuda N, Hattori Y: Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007, 43:117-137.
- [5] Umans JG, Wylam ME, Samsel RW, Edwards J, Schumacker PT: Effects of endotoxin *in vivo* on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148:1638-1645.
- [6] Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, Perez P, Meziani F: Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med* 2010, 36:2019-2029.
- [7] Bellissant E, Annane D: Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 68:293-303.
- [8] Bernardin G, Pradier C, Tiger F, Deloffre P, Mattei M: Blood pressure and arterial lactate level are early indicators of short-term survival in human septic shock. *Intensive Care Med* 1996:17-25.
- [9] Abid O, Akca S, Haji-Michael P, Vincent JL: Strong vasopressor support may be futile in the intensive care unit patient with multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000, 28:947-949.
- [10] Benchekroune S, Karpati PC, Berton C, Nathan C, Mateo J, Chaara M, Riche F, Laisne MJ, Payen D, Mebazaa A: Diastolic arterial blood pressure: a reliable early predictor of survival in human septic shock. *J Trauma* 2008, 64:1188-1195.
- [11] Benedict CR, Rose JA: Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. *Circ Shock* 1992, 38:165-172.
- [12] Alvarez S, Boveris A: Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:1472-1478.
- [13] Muniyappa R, Xu R, Ram JL, Sowers JR: Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, 278:H1762-1768.
- [14] Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC: Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990, 259:H1038-1043.
- [15] Boyle WA, 3rd, Parvathaneni LS, Bourlier V, Sauter C, Laubach VE, Cobb JP: iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circ Res* 2000, 87:E18-24.
- [16] Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM: Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 1995, 4:415-420.
- [17] Cobb JP, Natanson C, Quezado ZM, Hoffman WD, Koev CA, Banks S, Correa R, Levi R, Elin RJ, Hosseini JM *et al.*: Differential hemodynamic effects of L-NMMA in endotoxemic and normal dogs. *Am J Physiol* 1995, 268:H1634-1642.
- [18] Cohen RI, Shapir Y, Chen L, Scharf SM: Right ventricular overload causes the decrease in cardiac output after nitric oxide synthesis inhibition in endotoxemia. *Crit Care Med* 1998, 26:738-747.
- [19] Herbertson MJ, Werner HA, Walley KR: Nitric oxide synthase inhibition partially prevents decreased LV contractility during endotoxemia. *Am J Physiol* 1996, 270:H1979-1984.
- [20] Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC: Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161:1781-1785.
- [21] Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D *et al.*: Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004, 32:21-30.
- [22] Levy B, Valtier M, de Chillou C, Bollaert PE, Cane D, Mallie JP: Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock* 1999, 11:98-103.
- [23] Cauwels A: Nitric oxide in shock. *Kidney Int* 2007, 72:557-565.
- [24] Cauwels A, Buys ES, Thoonen R, Geary L, Delanghe J, Shiva S, Brouckaert P: Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J Exp Med* 2009, 206:2915-2924.
- [25] Vane J, Corin RE: Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003, 26:571-578.
- [26] Wang P, Zhou M, Cioffi WG, Bland KI, Ba ZF, Chaudry IH: Is prostacyclin responsible for producing the hyperdynamic response during early sepsis? *Crit Care Med* 2000, 28:1534-1539.
- [27] Schildknecht S, Bachschmid M, Baumann A, Ullrich V: COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2004, 18:757-759.
- [28] Hocherl K, Dreher F, Kurtz A, Bucher M: Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced cardiovascular failure. *Hypertension* 2002, 40:947-953.
- [29] Hocherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M: Activation of the PGI(2)/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertension* 2008, 52:330-335.
- [30] Staehr M, Madsen K, Vanhoutte PM, Hansen PB, Jensen BL: Disruption of COX-2 and eNOS does not confer protection from cardiovascular failure in lipopolysaccharide-treated conscious mice and isolated vascular rings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011, 301:R412-420.
- [31] Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Sumner WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD *et al.*: The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1997, 336:912-918.
- [32] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007, 87:315-424.
- [33] Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H: Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta *in vivo*. *FEBS Lett* 1995, 363:235-238.
- [34] Pacher P, Szabo C: Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol* 2008, 173:2-13.
- [35] Yard AC, Kadowitz PJ: Studies on the mechanism of hydrocortisone potentiation of vasoconstrictor responses to epinephrine in the anesthetized animal. *Eur J Pharmacol* 1972, 20:1-9.
- [36] Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D: Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:9753-9758.
- [37] Biesalski HK, McGregor GP: Antioxidant therapy in critical care--is the microcirculation the primary target? *Crit Care Med* 2007, 35:S577-583.
- [38] Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, MacAllister RJ, Wolzt M: High doses of vitamin C reverse Escherichia coli endotoxin-

- induced hyporeactivity to acetylcholine in the human forearm. *Circulation* 2002, 106:1460-1464.
- [39] Buckley JF, Singer M, Clapp LH: Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 2006, 72:220-230.
- [40] Collin S, Sennoun N, Dron AG, de la Bourdonnaye M, Montemont C, Asfar P, Lacolley P, Meziani F, Levy B: Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock. *Intensive Care Med* 2011, 37:861-869.
- [41] Morelli A, Lange M, Ertmer C, Broeking K, Van Aken H, Orecchioni A, Rocco M, Bacheloni A, Traber DL, Landoni G *et al.*: Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport. *Shock* 2007, 28:530-535.
- [42] Warrillow S, Egi M, Bellomo R: Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2006, 34:980-985.
- [43] Cauwels A, Brouckaert P: Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock* 2008, 29:577-582.
- [44] Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I *et al.*: Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008, 36:1937-1949.
- [45] Grunfeld JP, Eloy L: Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Hypertension* 1987, 10:608-618.
- [46] Williamson PM, Kohlhausen JL, Mangos GJ, Whitworth JA, Kelly JJ: Acute effects of hydrocortisone on plasma nitrate/nitrite activity and forearm vasodilator responsiveness in normal human subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005, 32:162-166.
- [47] Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC: I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1997, 16:4698-4707.
- [48] Prigent H, Maxime V, Annane D: Clinical review: corticotherapy in sepsis. *Crit Care* 2004, 8:122-129.
- [49] Leach M, Hamilton LC, Olbrich A, Wray GM, Thiemermann C: Effects of inhibitors of the activity of cyclo-oxygenase-2 on the hypotension and multiple organ dysfunction caused by endotoxin: a comparison with dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1998, 124:586-592.
- [50] Steiner A, Locher R, Sachinidis A, Vetter W: Cortisol-stimulated phosphoinositide metabolism in vascular smooth muscle cells: a role for glucocorticoids in blood pressure control? *J Hypertens Suppl* 1989, 7:S140-141.
- [51] Wu LL, Tang C, Liu MS: Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Shock* 1997, 7:318-323.
- [52] Baker CH, Sutton ET, Price JM, Ortiz-Tweed M, Nessellroth S: Attenuation of arteriolar alpha 2-adrenoceptor sensitivity during endotoxemia. *Am J Physiol* 1994, 267:H2171-2178.
- [53] Price SA, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN: Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. *J Surg Res* 1999, 83:75-80.
- [54] Hwang TL, Lau YT, Huang SF, Chen MF, Liu MS: Changes of alpha 1-adrenergic receptors in human liver during intraabdominal sepsis. *Hepatology* 1994, 20:638-642.
- [55] Takakura K, Taniguchi T, Muramatsu I, Takeuchi K, Fukuda S: Modification of alpha1 -adrenoceptors by peroxy-nitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. *Crit Care Med* 2002, 30:894-899.
- [56] de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D: Bench-to bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 2009, 13:230.
- [57] Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006, 354:449-461.
- [58] Pacheco ME, Beltran A, Redondo J, Manso AM, Alonso MJ, Salaices M: High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-betaII. *Eur J Pharmacol* 2006, 538:115-123.
- [59] Ellger B, Richir MC, van Leeuwen PA, Debaveye Y, Langouche L, Vanhorebeek I, Teerlink T, Van den Berghe G: Glycemic control modulates arginine and asymmetrical-dimethylarginine levels during critical illness by preserving dimethylarginine-dimethylaminohydroxylase activity. *Endocrinology* 2008, 149:3148-3157.
- [60] Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P *et al.*: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009, 360:1283-1297.
- [61] Annane D, Cariou A, Maxime V, Azoulay E, D'Honneur G, Timsit JF, Cohen Y, Wolf M, Fartoukh M *et al.*: Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010, 303:341-348.
- [62] Stoclet JC, Martinez MC, Ohlmann P, Chasserot S, Schott C, Kleschyov AL, Schneider F, Andriantsitohaina R: Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* 1999, 100:107-112.
- [63] Angus JA, Wright CE: Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000, 44:395-407.
- [64] Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, Mathura KR, Oudemans-van Straaten HM, Zandstra DF: Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 2002, 360:1395-1396.
- [65] Havel C, Arrich J, Losert H, Gamper G, Mullner M, Herkner H: Vasopressors for hypotensive shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD003709.
- [66] De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, Brasseur A, Defrance P, Gottignies P, Vincent JL *et al.*: Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med* 2010, 362:779-789.
- [67] Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE: Relation between muscle Na+K+ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet* 2005, 365:871-875.
- [68] Annane D, Vignon P, Renault A, Bollaert PE, Charpentier C, Martin C, Troche G, Ricard JD, Nitenberg G, Papazian L *et al.*: Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. *Lancet* 2007, 370:676-684.
- [69] LeDoux D, Astiz ME, Carpati CM, Rackow EC: Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. *Crit Care Med* 2000, 28:2729-2732.
- [70] Breslow MJ, Ligier B: Hyperadrenergic states. *Crit Care Med* 1991, 19:1566-1579.
- [71] Katsaragakis S, Kapralou A, Theodorou D, Markogiannakis H, Larentzakis A, Stamou KM, Drimousis P, Bramis I: Refractory septic shock: efficacy and safety of very high doses of norepinephrine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006, 28:307-313.
- [72] Ataman K, Jehmlich M, Kock S, Neumann S, Leischik M, Filipovic Z, Hopf HB: Short-term cardiovascular effects of plasmapheresis in norepinephrine-refractory septic shock. *Intensive Care Med* 2002, 28:1164-1167.
- [73] Honore PM, Matson JR: Short-term high-volume hemofiltration in sepsis: perhaps the right way is to start with. *Crit Care Med* 2002, 30:1673-1674.
- [74] Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, Egorina EM, Sovershaev MA, Sveinbjornsson B, Nedashkovsky EV, Bjertnaes LJ: Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit Care Med* 2001, 29:1860-1867.
- [75] Lange M, Ertmer C, Westphal M: Vasopressin vs. terlipressin in the treatment of cardiovascular failure in sepsis. *Intensive Care Med* 2008, 34(5):821-832.
- [76] Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA: Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 1997, 95:1122-1125.
- [77] Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Feydy A, Gray F, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* 2002, 30:497-500.

- [78] Russell JA, Walley KR, Singer J, Gordon AC, Hebert PC, Cooper DJ, Holmes CL, Mehta S, Granton JT, Storms MM *et al.*: Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008, 358:877-887.
- [79] Nilsson G, Lindblom P, Ohlin M, Berling R, Vernerström E: Pharmacokinetics of terlipressin after single i.v. doses to healthy volunteers. *Drugs Exp Clin Res* 1990, 16:307-314.
- [80] Morelli A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, Cecchini V, Bachetoni A, D'Alessandro M, Van Aken H, Pietropaoli P *et al.*: Continuous terlipressin versus vasopressin infusion in septic shock (TERLIVAP): a randomized, controlled pilot study. *Crit Care* 2009, 13:R130.
- [81] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helderbrand JD, Ely EW *et al.*: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001, 344:699-709.
- [82] Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A, Schneider F: Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med* 2007, 35:69-75.
- [83] Esmon CT: The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* 2006, 13:382-385.
- [84] Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW: Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001, 276:11199-11203.
- [85] Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, Cattani V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramarosan A, Regnault V *et al.*: Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 2009, 37:246-255.
- [86] Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G *et al.*: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002, 288:862-871.
- [87] Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H *et al.*: Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008, 358:111-124.
- [88] Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, Nagy A, Schuetz A, Lamm P, Knoll A *et al.*: Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med* 2003, 31:1068-1074.
- [89] Gibot S, Massin F, Alauzet C, Montemont C, Lozniewski A, Bollaert PE, Levy B: Effects of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 2008, 36:504-510.
- [90] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M, Early Goal-Directed Therapy Collaborative G: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001, 345:1368-1377.

## **Annexe 5 : $\beta$ 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock**



# $\beta$ 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock\*

Antoine Kimmoun, MD<sup>1,2,3</sup>; Huguette Louis, PhD<sup>3,4</sup>; Narimane Al Kattani, PhD<sup>2,3</sup>;  
Julie Delemazure, MD<sup>1,2,3</sup>; Nicolas Dessales, MD<sup>1,2,3</sup>; Chaojie Wei, PhD<sup>2,3</sup>; Pierre Yves Marie, MD, PhD<sup>3,5</sup>;  
Khodor Issa, PhD<sup>2,3</sup>; Bruno Levy, MD, PhD<sup>1,2,3</sup>

**Objective:** Preliminary experimental data suggest that selective  $\beta$ 1-blockers may improve ex vivo cardiac function in animal sepsis. Currently, the effects of esmolol on in vivo cardiac function and on vascular function are unknown. The present study was designed to examine the effects of the  $\beta$ 1-selective blocker esmolol on myocardial and vascular function in peritonitis-induced septic rats and to explore the inflammatory pathways involved in this process.

**Design:** Randomized animal study.

**Setting:** University research laboratory.

**Subjects:** Male Wistar rats.

**Interventions:** Four hours after cecal ligation and puncture, Wistar rats were randomly allocated to the following groups: control, esmolol, norepinephrine (started at 18 hr after the surgery), and esmolol (started at 4 hr after the surgery) + norepinephrine (started at 18 hr after the surgery). Assessment at 18 hours after surgery was focused on cardiac contractility and vascular ex vivo function. Cardiac and vascular protein expressions of nuclear factor  $\kappa$ B and endothelial nitric oxide synthase/Akt/inducible nitric oxide synthase pathways were assessed by Western blotting.

**\*See also p. 2039.**

<sup>1</sup>CHU Nancy, Service de Réanimation Médicale Brabois, Pole Cardiovasculaire et Réanimation Médicale, Hôpital Brabois, Vandoeuvre les Nancy, France.

<sup>2</sup>INSERM U 1116, Groupe Choc, Equipe 2, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France.

<sup>3</sup>Université de Lorraine, Nancy, France.

<sup>4</sup>INSERM U 1116, Groupe Choc, Equipe 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France.

<sup>5</sup>Service Médecine Nucléaire et Nancyclotep, CHU Nancy-Brabois, Vandoeuvre les Nancy, France.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

Dr. Delemazure received support for article research from Bourse "année recherche", received a grant from the French Society of Intensive Care Medicine, and disclosed government work. The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: [a.kimmoun@chu-nancy.fr](mailto:a.kimmoun@chu-nancy.fr)

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

**DOI: 10.1097/CCM.0000000000001078**

**Measurements and Main Results:** When compared with sham-operated animals, cecal ligation and puncture animals developed hypotension, cardiac depression, and vascular hyporesponsiveness to vasopressor treatment. Esmolol infusion increased cardiac contractility and restored mesenteric vasoreactivity. This effect was associated with a decrease in nuclear factor  $\kappa$ B activation, an increase in Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and a decrease in inducible nitric oxide synthase expression both at the cardiac and vessel level. Esmolol infusion was also associated with an up-regulation in  $\alpha$ 1-vascular adrenoceptors.

**Conclusion:** Adjunction of selective  $\beta$ 1-blockade to standard septic shock management enhances intrinsic cardiac contractility and vascular responsiveness to catecholamines. These protective cardiovascular effects are likely predominantly attributed to the anti-inflammatory effect of esmolol. (*Crit Care Med* 2015; 43:e332–e340)

**Key Words:** animal model;  $\beta$ -blockade; cardiac function; esmolol; septic shock; vasoreactivity

Septic shock is typically associated with an excessive and inappropriate immune response against infection (1). The massive release of proinflammatory factors is associated with depressed cardiac function and vascular hyporesponsiveness to vasopressors (2–4). Various approaches have been used in the treatment of septic shock; however, attempts at modulating the inflammatory response in sepsis have been, by in large, disappointing. Previous studies have shown that  $\beta$ 1-adrenoceptor antagonism decreases local and systemic inflammation (5–7). Therefore, the modulation of the adrenergic system with  $\beta$ -blockers could represent an innovating approach in septic shock. However, sepsis-induced myocardial suppression has largely resulted in the avoidance of  $\beta$ 1-adrenoceptor antagonist use in the treatment of septic shock. In the last 10 years, increasing experimental evidence has suggested that  $\beta$ 1-adrenergic modulation may improve cardiac function during septic shock through anti-inflammatory and cardioprotective effects (8, 9). Suzuki et al (10) found that pretreatment with esmolol reduced circulating levels of proinflammatory cytokines and improved ex vivo cardiac function in rats with normotensive



sepsis induced by cecal ligation and puncture. Ackland et al (8) further observed an increase in stroke volume associated with a reduction in heart rate. Two preliminary clinical studies found that esmolol use in septic shock patients was associated with no changes or a decrease in norepinephrine requirement (11, 12). In one of these studies, a phase II trial,  $\beta$ 1-blockade with esmolol, was effective in the control of heart rate and associated with beneficial hemodynamic effects. Indeed, stroke volume was increased and norepinephrine requirement decreased when compared to the standard management group (12).

There is currently a clear lack of data regarding the effects of esmolol 1) when used after septic shock induction in well-resuscitated animals including fluids, vasopressor, and antibiotics, 2) on in vivo cardiac function since stroke volume is not sufficient to assess cardiac function, and 3) on vascular function.

In light of the above, we hypothesized that 1) selective  $\beta$ 1-blockade with esmolol prevents sepsis-induced myocardial and vascular dysfunction in a cecal ligation and puncture (CLP)-induced model of septic shock and that 2) this improvement involves down-regulation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and iNOS pathways with decreased production of proinflammatory cytokines.

## METHODOLOGY

### Animals

Male Wistar rats (Charles River, France) weighing 300–400 g were investigated after an acclimation period of at least 1 week before experimentation. All animal experimentations were performed in accordance with institutional guidelines and protocols approved by the French Animal Care Committee in keeping with European regulations. The procedure for the care and euthanasia of study animals was in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals.

### Shock Model: CLP

Rats were anesthetized with isoflurane using 60% oxygen and a 2–3 cm ventral midline incision was performed. The cecum was ligated just distal to the ileocecal valve to avoid intestinal obstruction and punctured with a 21-gauge needle. The cecum was gently compressed to extrude cecal contents and returned to the abdomen after which the incision was closed with suture. The left external jugular vein was cannulated (tubing PE-50) under sterile conditions with the catheter tunneled subcutaneously to the back of the neck where it was attached to a swivel device. Four hours after the surgery, all treated rats received a continuous infusion of saline, analgesic (nalbuphine, 0.2 mg/kg/hr), and antibiotic (imipenem, 10 mg/kg/). At this point, rats were randomized to receive either only saline or esmolol (diluted in saline and infused at 300  $\mu$ g/kg/min). Infusion rate was fixed for all groups (including sham) at 4 mL/hr with equivalent amounts of sodium.

### Experimental Design

Four hours after CLP, animals were randomly divided into five groups and assessed 18 hours onward after surgery: sham-operated rats, CLP, CLP + esmolol, CLP + norepinephrine

(from 1 to 2  $\mu$ g/kg/min started at 18 hr after the surgery [H18] during 1 hr to increase mean arterial pressure by 20%), and CLP + esmolol + norepinephrine (from 1 to 2  $\mu$ g/kg/min started at H18 during 1 hr to increase mean arterial pressure by 20%). The CLP + esmolol group was specifically designed to assess the inflammatory impact of esmolol in septic shock.

Two sets of experiments were performed for in vivo hemodynamic measurements by PET investigation and conductance catheter, respectively. A third set was conducted to assess ex vivo vascular reactivity studies by myography and for plasma and tissue analysis (in sham, CLP, and CLP + esmolol groups only). A last set of experiments assessed the survival rate (in sham, CLP, and CLP + esmolol groups only).

### PET Procedure

For more details, see **supplemental data** (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B311>). A first set of experiments was performed 18 hours after CLP to assess cardiac output, left ventricular end-diastolic volume, left ventricular end-systolic volume, and left ventricular ejection fraction. Peak ejection rate, a load-dependent index of left ventricular systolic function, and peak filling rate, a load-dependent index of diastolic function, were also calculated.

### Catheter Conductance Procedure

For more details, see supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B311>). A second set of experiments was performed 18 hours after CLP to assess  $E_{\max}$ , a preload-independent index of contractility.

### Vascular Reactivity Procedure

The third set of experiments assessed vascular reactivity. After euthanasia of the animals by exsanguination, the mesenteries were removed and their vasoreactivity studied.

Vascular reactivity of small mesenteric arterial (radius, 200–400  $\mu$ m) rings was studied on a wire myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as previously described (13). The experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution with the following composition (in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 14.9 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5.5 glucose, continuously bubbled with 95% oxygen and 5% CO<sub>2</sub>. After an equilibration period (at least 20 min) under optimal passive tension, two successive contractions in response to the combination of KCl depolarization (100 mM) and phenylephrine (10  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used to test the maximal contractile capacity of the vessels. After a 20-minute washout period, concentration-response curves to phenylephrine were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (1 nM to 100  $\mu$ M) in order to determine the same concentration producing an equal level of contraction in the different groups. To study endothelium-dependent relaxation, small mesenteric rings with functional endothelium were precontracted with phenylephrine (1  $\mu$ M) and then exposed to increasing incremental concentrations of acetylcholine (1 nM to 100  $\mu$ M; Sigma, St. Louis, MO). The presence of functional

endothelium was confirmed with acetylcholine (1  $\mu$ M), which elicited a relaxation greater than 50%.

### Specific Biological Assays

Blood, withdrawn 18 hours after the surgery, was centrifuged (4,000 rpm, 15 min, 4°C) and the resulting plasma aliquoted and stored at -80°C until biochemical analysis. The heart and abdominal aorta were immediately excised after euthanasia and stored at -80°C until analyses.

### Cytokine Analyses

For more details, see supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B311>). The plasma was analyzed for specific proteins using proteome profiler arrays for pro- and anti-inflammatory cytokine factors according to the manufacturer's instructions.

### RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Primers for quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were obtained from Eurogentec (Angers, France). Total RNA extraction was carried out with the RNA Plus mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf Cedex, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). cDNA obtained from the RT reaction was subjected to quantitative PCR using iTaq Fast SYBR Green Supermix with ROX (Biorad). The primer and concentrations were optimized according to the manufacturer's guidelines. Expression of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoreceptor messenger RNA (mRNA) was measured using iTaq Fast SYBR Green Supermix (Biorad). The PCR reaction variables were as follows: incubation at 50°C for 2 minutes, incubation at 95°C for 10 minutes, and thereafter 40 denaturation cycles at 95°C for 15 seconds and annealing and extension at 60°C for 1 minute. Each sample was determined in duplicate. To determine relative mRNA levels, a standard curve for each gene was created using RNA isolated from the CLP group. Isolated RNA was reverse-transcribed, and dilution series of cDNA ranging from 1 pg to 10 ng were subjected to real-time PCR. The obtained threshold cycle values were plotted against the dilution factor to create a standard curve. Relative mRNA levels in the test samples were then calculated from the standard curve.

### Western Blotting

Aorta and heart were homogenized and lysed. Proteins (25  $\mu$ g) were separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Blots were probed with the following antibodies: anti-iNOS (BD Biosciences, San Jose, CA), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (rabbit anti-rat eNOS, phosphorylated [ser1177]; Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France), phosphorylated-AKT (p-AKT) (rabbit anti-rat Akt, phosphorylated [ser473]; Cell Signaling Technology), phospho-Jnk/JNK (mouse, anti-rat Jnk/JNK, phosphorylated [Thr183/Tyr185]; Cell Signaling

Technology), phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (mouse, anti-rat p38 MAPK, phosphorylated [Thr180/Tyr182]; Cell Signaling Technology), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (rabbit anti-rat p44/p42 MAPK, phosphorylated [Thr1202/Tyr204]; Cell Signaling Technology), phosphorylated NF- $\kappa$ B (Phospho-NF- $\kappa$ B p105 [Ser933] [18E6]; Cell Signaling Technology), and anti  $\alpha_1$ -adrenoreceptor (sheep, anti-rat  $\alpha_1$ -adrenoreceptor [sc-1477]; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Bound antibodies were detected with a secondary peroxidase-conjugated anti-goat IgG (Promega, Madison, WI). The blots were visualized using an enhanced chemiluminescence system (ECL Plus; Amersham, GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France).

### Survival Study

Following the same procedure described in the *Experimental Design* section, the survival rate was assessed in a last set of experiments. In a block-randomized blinded manner, survival was assessed in two groups: CLP and CLP + esmolol. Rats were given access to food and water ad libitum. Census of animals was undertaken twice a day.

### Statistical Analysis

Results are expressed as median with minimum and maximum values (median [min-max]) and in figures as median and upper edges of error bars representing the 75th percentile. Because of the small sample size, all analyses were performed with nonparametric methods. The aforementioned characteristics were compared between Sham and CLP groups with a Wilcoxon-Mann-Whitney test and between the different treated groups with a Kruskal-Wallis test. Upon reaching statistical significance in the Kruskal-Wallis test, further comparisons were performed with the Dunn test, a post hoc nonparametric test. Ex vivo vasoreactivity was assessed in the different study groups in response to increasing concentrations of phenylephrine (Friedman test). The nonlinear curve-fitting tool of PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA) was used to depict the results of vasoreactivity testing. Survival was assessed by Kaplan-Meier analysis. The two-tailed statistical significance level was set at 0.05. All statistical analyses were performed using GraphPad Software 6.0, (San Diego, CA).

## RESULTS

### Model Characterization

When compared with sham animals, CLP animals were associated with arterial hypotension (112 mm Hg [95–147 mm Hg] vs 97 mm Hg [50–100 mm Hg];  $p = 0.02$ ) and hyperlactatemia (1.3 mmol/L [0.6–2.3 mmol/L] vs 3.6 mmol/L [2.3–4.2 mmol/L];  $p = 0.004$ ) (**Table 1**). Load-dependent myocardial variables showed no differences between sham and CLP animals (ejection fraction, 55% [48–67%] vs 51% [42–66%];  $p = 0.51$ ; cardiac output, 102 mL/min [76–146 mL/min] vs 102 mL/min [48–141 mL/min];  $p = 0.89$ ; peak ejection rate, -1.87 s<sup>-1</sup> [-2.28 to -1.29 s<sup>-1</sup>] vs -1.81 s<sup>-1</sup> [-2.22 to -1.59 s<sup>-1</sup>];

**TABLE 1. Effects of Cecal Ligation and Puncture on Myocardial Function Using Micro-PET Imaging**

Variables	Sham		Cecal Ligation and Puncture		<i>p</i>
	<i>n</i> = 6		<i>n</i> = 6		
	Median	Minimum–Maximum	Median	Minimum–Maximum	
Heart rate (min <sup>-1</sup> )	445	428–487	426	384–497	0.33
Mean arterial pressure (mm Hg)	112	95–147	97	50–100	0.02
End-diastolic volume (μL)	442	349–523	434	296–545	0.67
End-systolic volume (μL)	190	121–265	193	173–268	0.78
Stroke volume (μL)	234	165–330	226	123–345	0.99
Ejection fraction (%)	55	48–67	51	42–66	0.51
Cardiac output (μL/min)	102	76–146	102	48–141	0.89
Peak ejection rate (s <sup>-1</sup> )	-1.87	-2.28 to -1.29	-1.81	-2.22 to -1.59	0.47
Peak fraction rate (s <sup>-1</sup> )	2.2	1.67–2.57	1.69	1.55–2.07	0.09
Lactatemia (mmol/L)	1.3	0.60–2.3	3.6	2.3–4.2	0.004

$p = 0.47$ ; and peak fraction rate,  $2.2 \text{ s}^{-1}$  [1.67–2.57  $\text{s}^{-1}$ ] vs  $1.69 \text{ s}^{-1}$  [1.55–2.07  $\text{s}^{-1}$ ];  $p = 0.09$ ).

Changes detected by conductance catheter readings showed that  $E_{\text{max}}$ , a load-independent left ventricular systolic function variable, was impaired in CLP rats compared with sham animals (5.35 mm Hg/μL [4.1–5.63 mm Hg/μL] vs 1.32 mm Hg/μL [0.54–1.35 mm Hg/μL];  $p = 0.007$ ) (Fig. 1).

Although phenylephrine induced a dose-dependent increase in tension in small mesenteric vessels in sham rats, CLP conversely blunted phenylephrine-stimulated contraction ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2A). Acetylcholine produced a concentration-dependent relaxation of isolated small mesenteric vessels in sham animals, whereas vascular responses to acetylcholine were decreased in small mesenteric arteries of CLP rats ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2B).

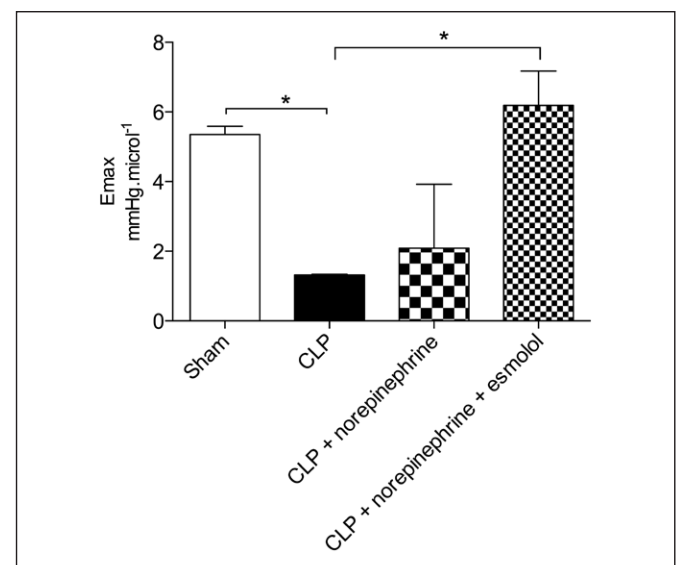
### Hemodynamic Effects Following Esmolol Therapy in Norepinephrine-Treated Rats

Lactate levels were decreased in the CLP + norepinephrine + esmolol-treated group compared with untreated CLP and CLP + norepinephrine groups (2.1 mmol/L [1.5–2.7 mmol/L] vs CLP: 3.6 mmol/L [2.3–4.2 mmol/L] vs CLP + norepinephrine: 3.0 mmol/L [1.7–4.4 mmol/L];  $p = 0.04$ ) (Table 2).

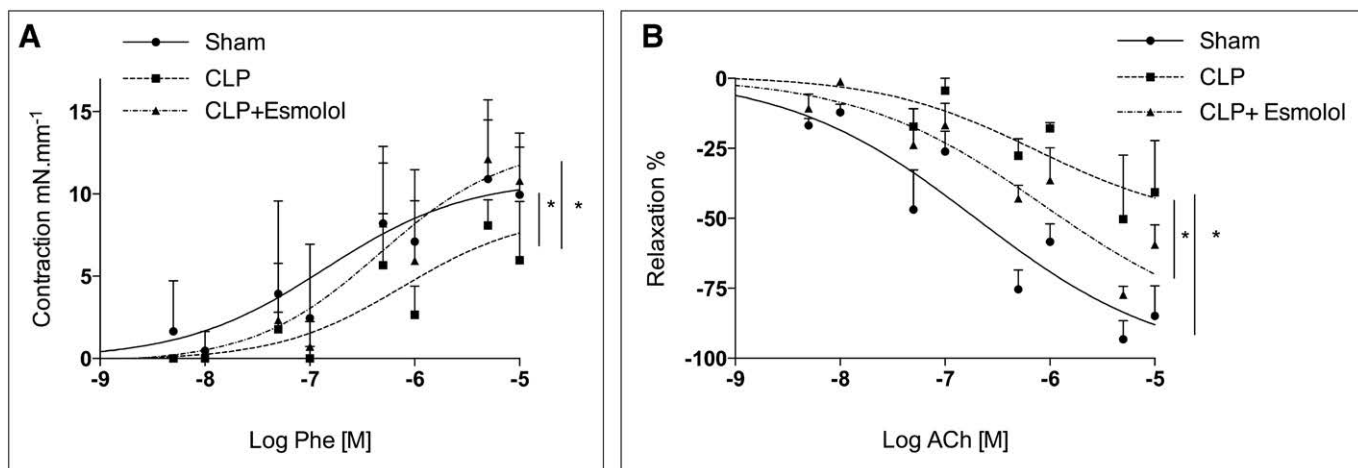
**Cardiac Effects.** Heart rate decreased in the CLP + norepinephrine + esmolol-treated group compared with untreated groups (369 min<sup>-1</sup> [331–394 min<sup>-1</sup>] vs CLP: 426 min<sup>-1</sup> [384–497 min<sup>-1</sup>] vs CLP + norepinephrine: 445 min<sup>-1</sup> [342–541 min<sup>-1</sup>];  $p = 0.02$ ), whereas mean arterial pressure tended to increase in both norepinephrine-treated groups compared with CLP (CLP + norepinephrine + esmolol: 101 mm Hg [90–107 mm Hg] vs CLP + norepinephrine: 111 mm Hg [81–124 mm Hg] vs CLP: 97 mm Hg [50–100 mm Hg];  $p = 0.09$ ). Cardiac output was not significantly reduced by the adjunction of esmolol (CLP + norepinephrine + esmolol: 113 mL/min [101–131 mL/min]

vs CLP + norepinephrine: 118 mL/min [89–236 mL/min] vs CLP: 102 mL/min [48–141 mL/min];  $p = 0.22$ ), whereas stroke volume was significantly increased in CLP + norepinephrine + esmolol compared with the other groups (305 μL [279–375 μL] vs CLP + norepinephrine: 274 μL [230–438 μL] vs CLP: 226 μL [123–345 μL];  $p = 0.04$ ) (Table 2).

As shown in Figure 1,  $E_{\text{max}}$  increased in the CLP + norepinephrine + esmolol group compared with CLP (6.2 mm Hg/μL [3.93–7.72 mm Hg/μL] vs CLP: 1.32 mm Hg/μL [0.54–1.35 mm Hg/μL] vs CLP + norepinephrine: 2.09 mm Hg/μL [1.25–5 mm Hg/μL];  $p = 0.001$ ).



**Figure 1.** Comparison of cardiac inotropism (y-axis,  $E_{\text{max}}$ ) independently of preload condition with a conductance catheter ( $n = 6$ ).  $E_{\text{max}}$  displays a significant increase in the esmolol group. The different groups are represented on the x-axis. CLP = cecal ligation and puncture.



**Figure 2.** Ex vivo vascular responsiveness to phenylephrine (Phe; **A**) and concentration-response curves to acetylcholine (ACh; **B**) in mesenteric resistance arteries ( $n = 6$  per group). A, Contraction of the vessel (in mN/mm) as a function of increasing concentrations of phenylephrine expressed as log of phenylephrine [M]. B, Relaxation of the vessel (in percent) as a function of increasing concentrations of acetylcholine. Vasoreactivity and relaxation are significantly improved in the cecal ligation and puncture (CLP) + esmolol group compared with the other groups ( $p < 0.05$ ). The symbols (circles, squares, and triangles) represent median. Upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group.

**Vascular Effects.** Ex vivo vasoreactivity of mesenteric arteries was completely restored to sham levels in the group treated with esmolol ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A)). Relaxation to acetylcholine was also partially restored ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2B).

**Effects of  $\beta 1$ -Adrenergic Blockade on Survival**

Esmolol increased median time to death in CLP animals by 10 hours (log rank test;  $p = 0.0002$ ) (Fig. 3). Eighteen hours after CLP, the mortality rate was 13 of 15 while adjunction of esmolol was associated with a mortality rate of 6 of 15.

**TABLE 2. Comparison of Hemodynamic Characteristics 18 Hours After Cecal Ligation and Puncture Using the Micro-PET Imaging System**

Variables	CLP		CLP + Norepinephrine		CLP + Norepinephrine + Esmolol		$p$
	Median	Minimum-Maximum	Median	Minimum-Maximum	Median	Minimum-Maximum	
Heart rate ( $\text{min}^{-1}$ )	426	384–497	445	342–541	369 <sup>a</sup>	331–394	0.02
Mean arterial pressure (mm Hg)	97	50–100	111	81–124	101	90–107	0.09
End-diastolic volume ( $\mu\text{L}$ )	434	296–545	444	397–759	500	400–551	0.60
End-systolic volume ( $\mu\text{L}$ )	193	173–268	187	122–321	195	119–221	0.82
Stroke volume ( $\mu\text{L}$ )	226	123–345	274	230–438	305 <sup>b</sup>	279–375	0.04
Ejection fraction (%)	51	42–66	67 <sup>c</sup>	57–70	64 <sup>b</sup>	58–69	0.01
Cardiac output ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	102	48–141	118	89–236	113	101–131	0.22
Peak ejection rate ( $\text{s}^{-1}$ )	-1.81	-2.22 to -1.59	-2.03	-2.34 to -1.74	-2.10 <sup>4</sup>	-2.38 to -1.85	0.09
Peak fraction rate ( $\text{s}^{-1}$ )	1.69	1.55–2.07	1.95	1.24–2.68	2.29	2.03–2.63	0.04
Norepinephrine dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )			1.3	1–2	1.2	0.4–1.5	0.40
Lactatemia (mmol/L)	3.6	2.3–4.2	3.0	1.7–4.4	2.1 <sup>b</sup>	1.5–2.7	0.04

CLP = cecal ligation and puncture.

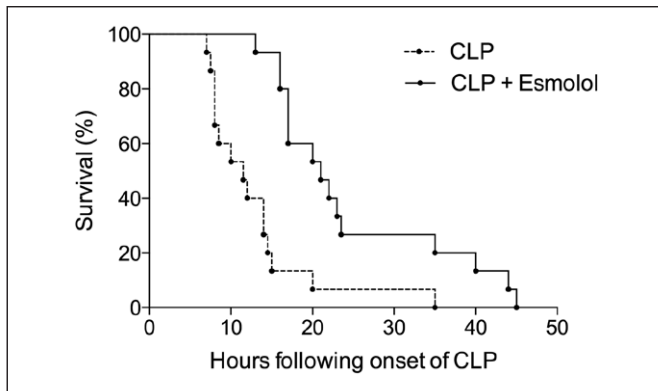
Multiple comparisons included:

<sup>a</sup>CLP + norepinephrine versus CLP + norepinephrine + esmolol;

<sup>b</sup>CLP + norepinephrine + esmolol versus CLP; and

<sup>c</sup>CLP versus CLP + norepinephrine.

Esmolol infusion was initiated 4 hr after CLP while norepinephrine was initiated 18 hr after CLP.



**Figure 3.** Survival curve following post esmolol infusion in cecal ligation and puncture (CLP). Esmolol was initiated 4 hr after the onset of CLP ( $n = 15$  rats per group;  $p < 0.0002$ ; log rank test).

### Effect of Esmolol on Circulatory Inflammatory Mediators

For **Supplemental Figure S1**, see Supplemental Digital Content 2 (<http://links.lww.com/CCM/B312>).

Compared with CLP, the adjunction of esmolol enhanced the generation of anti-inflammatory cytokines (interleukin [IL]-1ra, IL-10, and interferon gamma-induced protein-10) while decreasing that of proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-2, and IL-6).

### Modulation on Inflammatory Pathways Induced by Esmolol in Myocardium and Abdominal Aorta

**Myocardium.** CLP was associated with an increase in cardiac iNOS protein expression, which was reduced in the CLP + esmolol group ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S2A**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). The expression level of phosphorylated Akt-to-Akt ratio was decreased in CLP animals ( $p < 0.05$ ) while the adjunction of esmolol did not significantly increase the latter (**Supplemental Fig. S2B**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). Expression levels of p-eNOS-to-eNOS ratio were also decreased in CLP animals but increased in CLP + esmolol animals ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S2C**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). CLP increased phosphorylated NF- $\kappa$ B expression, whereas this CLP-induced increase was reduced in CLP + esmolol ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S2D**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>).

CLP did not significantly influence the phosphorylation of p-Jnk/Jnk but decreased the phosphorylation of p-38 MAPK (**Supplemental Fig. S2, E and F**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). Caspases 8 and 3 were also not influenced in CLP and CLP + esmolol (**Supplemental Fig. S2, G and H**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). Conversely, p-P53/p53 was significantly reduced in CLP + esmolol compared with CLP animals ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S2I**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>).

**Abdominal Aorta.** Changes in abdominal aortic iNOS, eNOS, p-AKT/AKT, and phosphorylated NF- $\kappa$ B expression levels were similar to those observed in heart (**Fig. 4A–D**). P-38 MAPK and

p-Jnk/Jnk expression were increased in the CLP group compared with sham animals ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S3, A and B**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). Esmolol only decreased the level of p-Jnk/Jnk expression compared with CLP ( $p < 0.05$ ) (**Supplemental Fig. S3B**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). Compared with the sham group, CLP induced only an increase in the expression of caspase 8 but not in caspase 3 and P53 (**Supplemental Fig. S3 C–E**, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/B312>). When animals were exposed to esmolol, only a trend in caspase 8 reduction was observed compared with the CLP group.

### Adrenergic Modulation Following Esmolol Infusion

Sepsis was associated with a down-regulation of mRNA (**Fig. 5A**) and protein (**Fig. 5B**) expression of  $\alpha$ 1-adrenoreceptors while adjunction of esmolol up-regulated their expression (**Fig. 5A**;  $p < 0.05$  and **Fig. 5B**;  $p = 0.06$ ).

## DISCUSSION

The main findings of the present study are that selective  $\beta$ 1-blockade with esmolol improved both vascular reactivity to vasopressor therapy and in vivo cardiac function and increased survival time in an experimental model of septic shock. These beneficial effects were associated with the down-regulation of proinflammatory pathways and the up-regulation of anti-inflammatory pathways at both the systemic and tissue levels. The observed improvement in vascular reactivity was furthermore associated with an up-regulation of  $\alpha$ 1-adrenoreceptor expression and an increase in in situ activation/expression of eNOS through the AKT pathway and a reduced expression of iNOS.

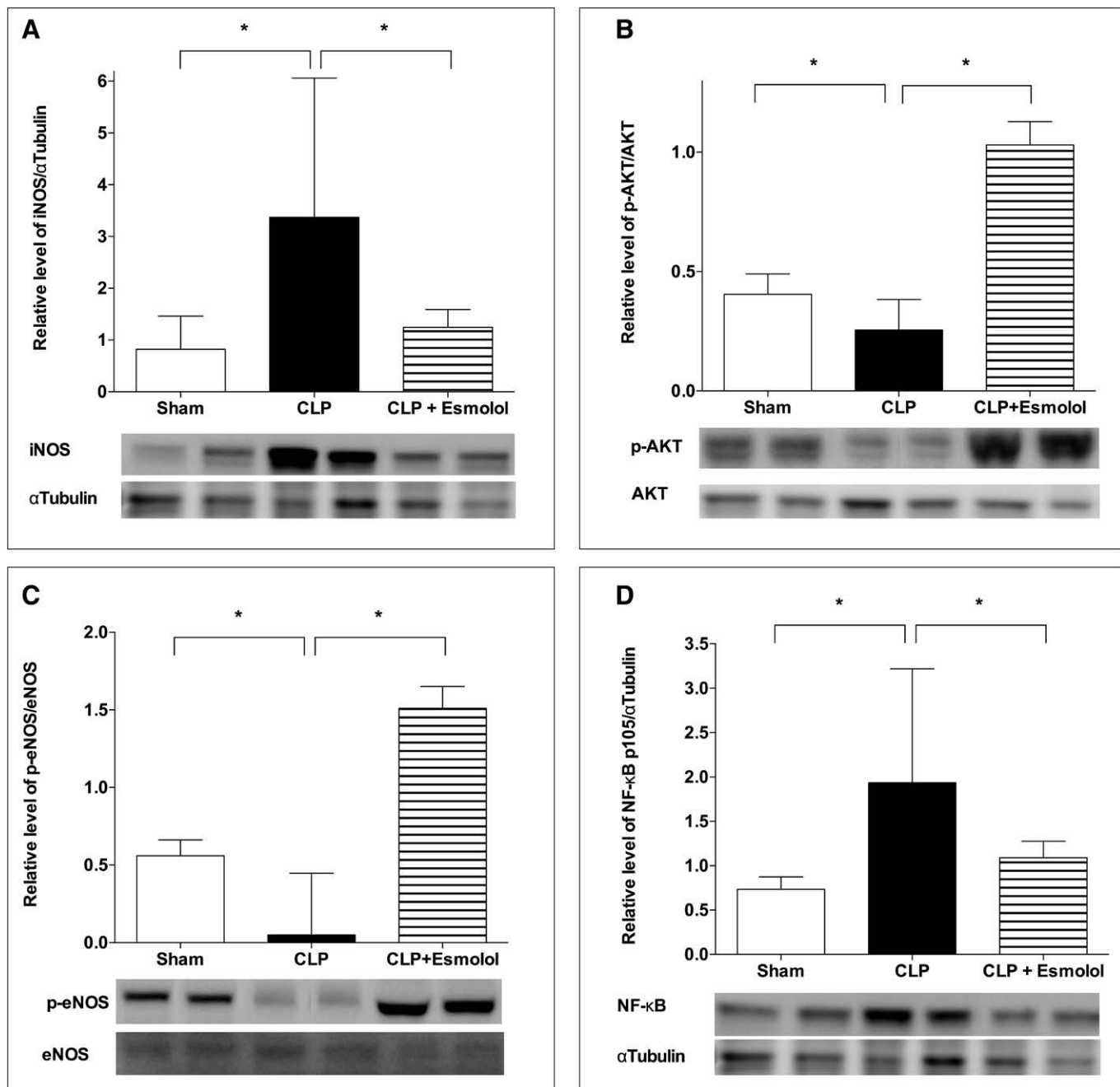
### Model Characteristics

To investigate the cardiovascular response to esmolol, we deliberately used a severe model of resuscitated septic shock. Importantly, in order to mimic the clinical setting, our study rats were treated with esmolol 4 hours after the onset of sepsis and not prior to sepsis. Resuscitation included the use of adapted antibiotics, volume resuscitation, and vasopressor treatment. As previously reported, this model displayed all the characteristics of a severe septic shock and was characterized by a profound and ultimately lethal hypotension with a maintained cardiac output and lactic acidosis (14). In vivo load-independent cardiac variables as well as ex vivo vascular responsiveness to vasopressor agents were also depressed (14, 15).

These hemodynamic alterations were associated with substantial inflammation in heart, vessels, and plasma, namely iNOS and NF- $\kappa$ B up-regulation and proinflammatory cytokine production (16). Furthermore, there was a down-regulation of  $\alpha$ 1-adrenoreceptor expression in vessels (17, 18). Of importance, there was increased cardiac NF- $\kappa$ B expression associated with depressed cardiac function (19, 20).

### Selective $\beta$ 1-Blockade Improves Cardiac and Vascular Function

Confirming previous experimental studies, esmolol did not worsen cardiovascular function in septic shock animals. Despite

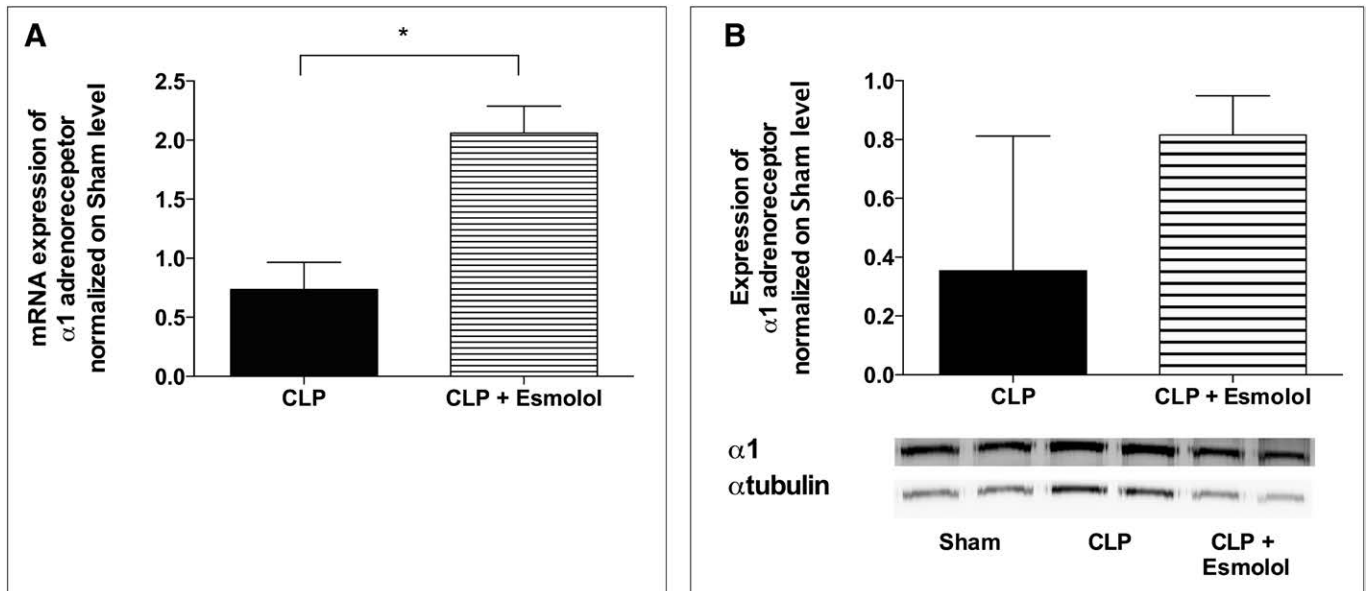


**Figure 4.** Western blot analysis of protein expression in abdominal aorta. Western blots revealing inducible nitric oxide (iNOS) (A), phosphorylated-protein kinase B (B), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (C), and phosphorylated nuclear factor-κB (NFκB) (D). Proteins are expressed in abdominal aorta lysates ( $n = 6$ ) from all groups of rats. A typical Western blot is shown below each histogram. Densitometric analysis was used to calculate the normalized protein ratio (protein to  $\alpha$ -tubulin), which was set at 1 for the control group. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of *error bars* represent the 75th percentile in each group. \* $p < 0.05$ . CLP = cecal ligation and puncture.

a marked reduction in heart rate, cardiac output was not significantly reduced (8, 10, 21). This could be explained by the increase in stroke volume likely due to an increase in diastolic time which attenuated the decrease in cardiac output. Importantly, we demonstrate for the first time an improvement in in vivo intrinsic myocardial function, as assessed by a conductance catheter, confirming previous findings reported in ex vivo isolated heart (10).

Theoretically, selective  $\beta$ 1-blockers do not act directly on vascular function since  $\beta$ 1-receptors are not expressed in the vessels. Nevertheless, we found that adding esmolol in CLP

rats treated with norepinephrine did not change MAP and markedly improved both sepsis-induced hyporesponsiveness to vasopressor treatment and sepsis-induced endothelial dysfunction. This result may explain previous human data in which esmolol used in norepinephrine-treated septic shock was associated with no change or a decrease in norepinephrine requirement (12). This finding should nonetheless be viewed in perspective with the better microcirculation observed in septic shock patients under esmolol (22). Whereas in septic shock patients, changes in norepinephrine dosages fail to



**Figure 5.** Messenger RNA (mRNA) ( $n = 5$ , **A**) and Western blot protein expression ( $n = 5$ , **B**) of  $\alpha 1$ -adrenoreceptors in abdominal aorta. Results were normalized to sham expression. A typical Western blot is shown. Densitometric analysis was used to calculate the normalized protein ratio (protein to  $\alpha$ -tubulin), which was set at 1 for the control group. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of *error bars* represent the 75th percentile in each group. CLP = cecal ligation and puncture.

improve sublingual microcirculation, adjunction of esmolol, likely through its anti-inflammatory effects, may explain the increase in microvascular flow index observed in the study by Morelli et al (22–24).

Finally, the improvement in cardiac and vascular function observed herein was associated with a decrease in lactate level, arguing for better metabolism/perfusion adequacy and increased survival length.

### Selective $\beta 1$ -Blockade: A Pivotal Role in Pro/Anti-inflammatory Balance

The  $\beta$ -adrenergic system is a well-known powerful modulator of the immune system.  $\beta 2$ -blockers appear to induce a pro-inflammatory profile, whereas  $\beta 1$ -blockade has the opposite effect (25). NF- $\kappa$ B activation plays a major role in septic shock due to its rapid regulation and the broad ranges of genes that it controls (26). Extensive research has established a clear role for NF- $\kappa$ B in the regulation of a wide variety of genes involved in immune function and inflammation responses (27). Given that NF- $\kappa$ B activates transcription of the iNOS gene and induces proinflammatory cytokine secretion, activation of NF- $\kappa$ B may play a role in the development of cardiac and vascular dysfunction in septic shock.

During sepsis, vascular dysfunction is tightly linked to iNOS overexpression and decreased eNOS and AKT phosphorylation while drugs that improve NF- $\kappa$ B/iNOS/eNOS/AKT coupling exhibit favorable effects on sepsis-induced vascular dysfunction (26–30). In the present study, esmolol reduced NF- $\kappa$ B and iNOS expression and increased eNOS phosphorylation in both cardiac and vessel tissues in septic animals. The marked improvement in intrinsic cardiac function and the recovery in microvascular responsiveness to catecholamines in our model could be partially explained by these results although other

mechanisms not explored in the present study may be involved such as the up-regulation of cardiac  $\beta 1$ -adrenoreceptors as demonstrated by Suzuki et al (10). Associated with NF- $\kappa$ B down-regulation, esmolol was found herein to enhance anti-inflammatory (IL-1ra, IL-10, and IP-10) and decrease proinflammatory cytokine generation (IL-1, IL-2, and IL-6) (31).

Concomitant with the decrease in proinflammatory pathway,  $\alpha 1$ -adrenergic vascular receptor expression was also found to be down-regulated. In accordance with previous studies, this down-regulation is likely a consequence of the massive release of proinflammatory cytokines generated by sepsis (18). Adjunction of esmolol was strongly associated with an up-regulation of  $\alpha 1$ -adrenoreceptor mRNA level and protein expression. Of note, the inhibition of NF- $\kappa$ B activation appears to be a major mechanism explaining the up-regulation of  $\alpha 1$ -adrenoreceptor expression in vessels (18).

### Limitations and Perspectives

A first limitation of the present study is the small size sample in each group. However, hemodynamic data from the conductance catheter, Micro TEP, and myography were all congruent. Furthermore, all rats evolved in the same survival pattern according to their group, hence conferring reliability and reproducibility to the results. Second, a commonly used dose of esmolol was infused in order to decrease heart rate (12). Nevertheless, as demonstrated,  $\beta$ -blockers act through numerous pathways and may be effective in decreasing inflammation even when using lower doses as observed in the study by Ibrahim-Zada et al (5). Although the present work confirms the potential beneficial effects of  $\beta 1$ -adrenoreceptor modulation during septic shock, caution is nonetheless warranted before translating from bench to bedside despite these initial promising results. We are currently investigating the effects of esmolol at the early

phase of resuscitated septic shock (Esmosepsis, NCT02068287) with a special emphasis on hemodynamic tolerance and microcirculation.

## CONCLUSIONS

In this experimental study, results demonstrate that the addition of a selective  $\beta_1$ -blockade to standard septic shock management in an animal model enhances intrinsic cardiac contractility and improves vascular responsiveness to catecholamines. These cardiovascular protective effects could be attributed to a down-regulation of inflammatory pathways. Further investigations are warranted to determine the effects of  $\beta_1$ -blockade on other organ functions and inflammatory patterns in septic shock.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Pierre Pothier for proofreading this article.

## REFERENCES

- Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885–891
- Viellard-Baron A: Septic cardiomyopathy. *Ann Intensive Care* 2011; 1:6
- Levy B, Collin S, Sennoun N, et al: Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: From bench to bedside. *Intensive Care Med* 2010; 36:2019–2029
- Rudiger A, Singer M: Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35:1599–1608
- Ibrahim-Zada I, Rhee P, Gomez CT, et al: Inhibition of sepsis-induced inflammatory response by  $\beta_1$ -adrenergic antagonists. *J Trauma Acute Care Surg* 2014; 76:320–327; discussion 327–328
- Kobayashi N, Mita S, Yoshida K, et al: Celiprolol activates eNOS through the PI3K-Akt pathway and inhibits VCAM-1 via NF-kappaB induced by oxidative stress. *Hypertension* 2003; 42:1004–1013
- Mori K, Morisaki H, Yajima S, et al: Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function. *Intensive Care Med* 2011; 37:1849–1856
- Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, et al: Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 2010; 38:388–394
- Rudiger A: Beta-block the septic heart. *Crit Care Med* 2010; 38:S608–S612
- Suzuki T, Morisaki H, Serita R, et al: Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* 2005; 33:2294–2301
- Balik M, Rulisek J, Leden P, et al: Concomitant use of beta-1 adrenoceptor blocker and norepinephrine in patients with septic shock. *Wien Klin Wochenschr* 2012; 124:552–556
- Morelli A, Ertmer C, Westphal M, et al: Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: A randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310:1683–1691
- Kimmoun A, Ducrocq N, Sennoun N, et al: Efficient extra- and intracellular alkalinization improves cardiovascular functions in severe lactic acidosis induced by hemorrhagic shock. *Anesthesiology* 2014; 120:926–934
- Ducrocq N, Kimmoun A, Furmaniuk A, et al: Comparison of equipressor doses of norepinephrine, epinephrine, and phenylephrine on septic myocardial dysfunction. *Anesthesiology* 2012; 116:1083–1091
- Sennoun N, Nacira S, Meziani F, et al: Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 2009; 37:246–255
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63–78
- Bucher M, Kees F, Taeger K, et al: Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Crit Care Med* 2003; 31:566–571
- Schmidt C, Kurt B, Höcherl K, et al: Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. *Shock* 2009; 32:239–246
- Boillot A, Massol J, Maupoil V, et al: Myocardial and vascular adrenergic alterations in a rat model of endotoxin shock: Reversal by an anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody. *Crit Care Med* 1997; 25:504–511
- Boillot A, Massol J, Maupoil V, et al: Alterations of myocardial and vascular adrenergic receptor-mediated responses in *Escherichia coli*-induced septic shock in the rat. *Crit Care Med* 1996; 24:1373–1380
- Aboab J, Sebille V, Jourdain M, et al: Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock. *Intensive Care Med* 2011; 37:1344–1351
- Morelli A, Donati A, Ertmer C, et al: Microvascular effects of heart rate control with esmolol in patients with septic shock: A pilot study. *Crit Care Med* 2013; 41:2162–2168
- Jhanji S, Stirling S, Patel N, et al: The effect of increasing doses of norepinephrine on tissue oxygenation and microvascular flow in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2009; 37:1961–1966
- Dubin A, Pozo MO, Casabella CA, et al: Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow: A prospective study. *Crit Care* 2009; 13:R92
- Sekut L, Champion BR, Page K, et al: Anti-inflammatory activity of salmeterol: Down-regulation of cytokine production. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:461–466
- Liu SF, Malik AB: NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:L622–L645
- Brown MA, Jones WK: NF-kappaB action in sepsis: The innate immune system and the heart. *Front Biosci* 2004; 9:1201–1217
- Issa K, Kimmoun A, Collin S, et al: Compared effects of inhibition and exogenous administration of hydrogen sulphide in ischaemia-reperfusion injury. *Crit Care* 2013; 17:R129
- Joyce DE, Grinnell BW: Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 2002; 30:S288–S293
- Sun Z, Andersson R: NF-kappaB activation and inhibition: A review. *Shock* 2002; 18:99–106
- Guirao X, Kumar A, Katz J, et al: Catecholamines increase monocyte TNF receptors and inhibit TNF through beta 2-adrenoreceptor activation. *Am J Physiol* 1997; 273:E1203–E1208



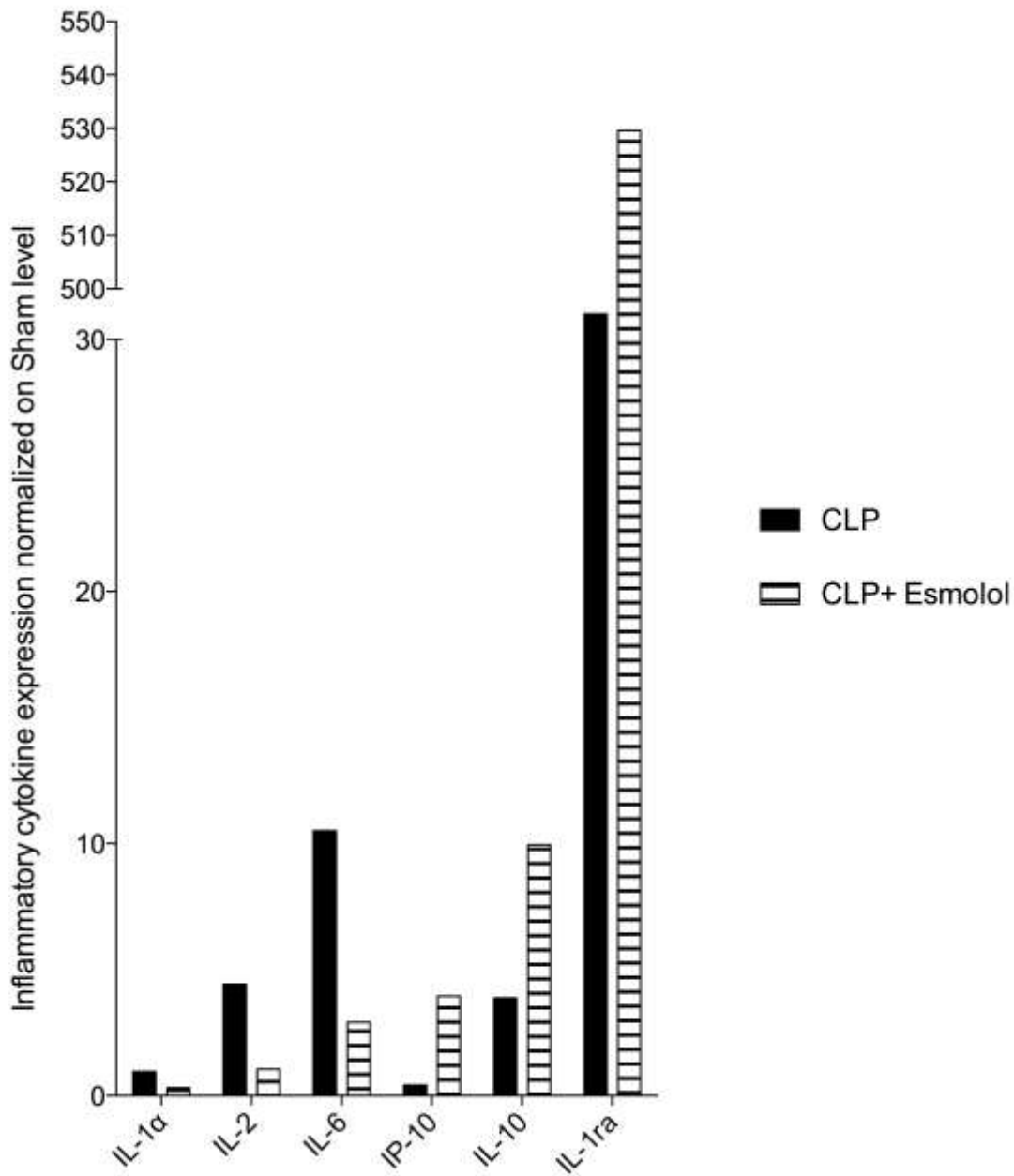


Figure S1: Inflammatory cytokine expression in CLP (n=5) and CLP + esmolol (n=5) groups normalized to Sham level. The plasma of each animal was pooled in the allocated group. CLP: cecal ligation and puncture.

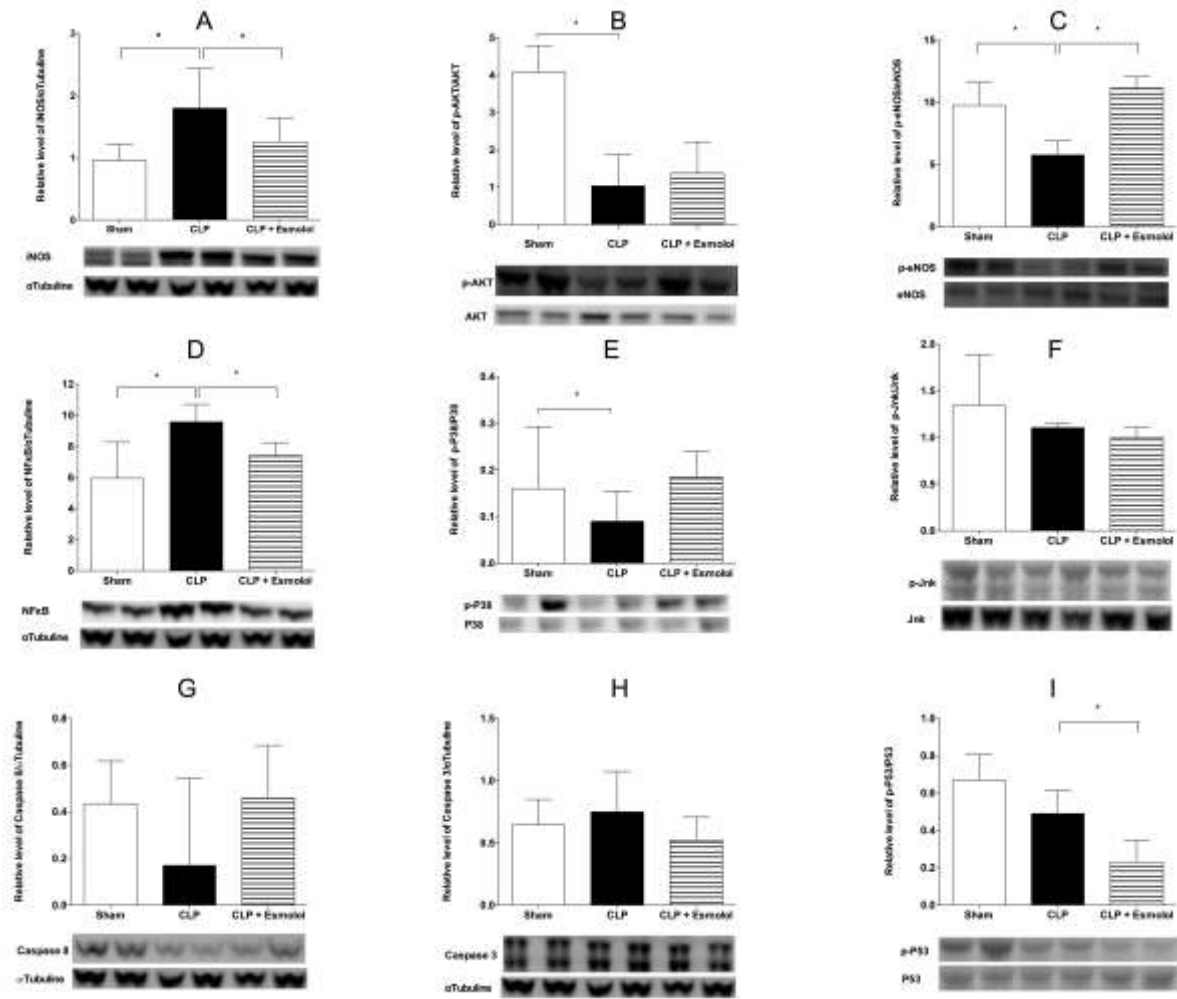


Figure S2: Western blot analysis of protein expression in heart. Western blots revealing (A) inducible nitric oxide (iNOS), (B) p-AKT, (C) phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), (D) nuclear factor-  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), (E) phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase (p-p38), (F) phosphorylated Jun amino-terminal kinase (p-JNK), (G) caspase 8, (H) caspase 3 and (I) tumor protein p53 (P53) expression. Proteins are expressed in whole heart lysates ( $n = 6$ ) from all groups of rats. A typical Western blot is shown below each histogram. Densitometric analysis was used to calculate the normalized protein ratio (protein to  $\alpha$ -tubulin), which was set at 1 for the control group. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group. \* $P < 0.05$ . CLP: cecal ligation and puncture.

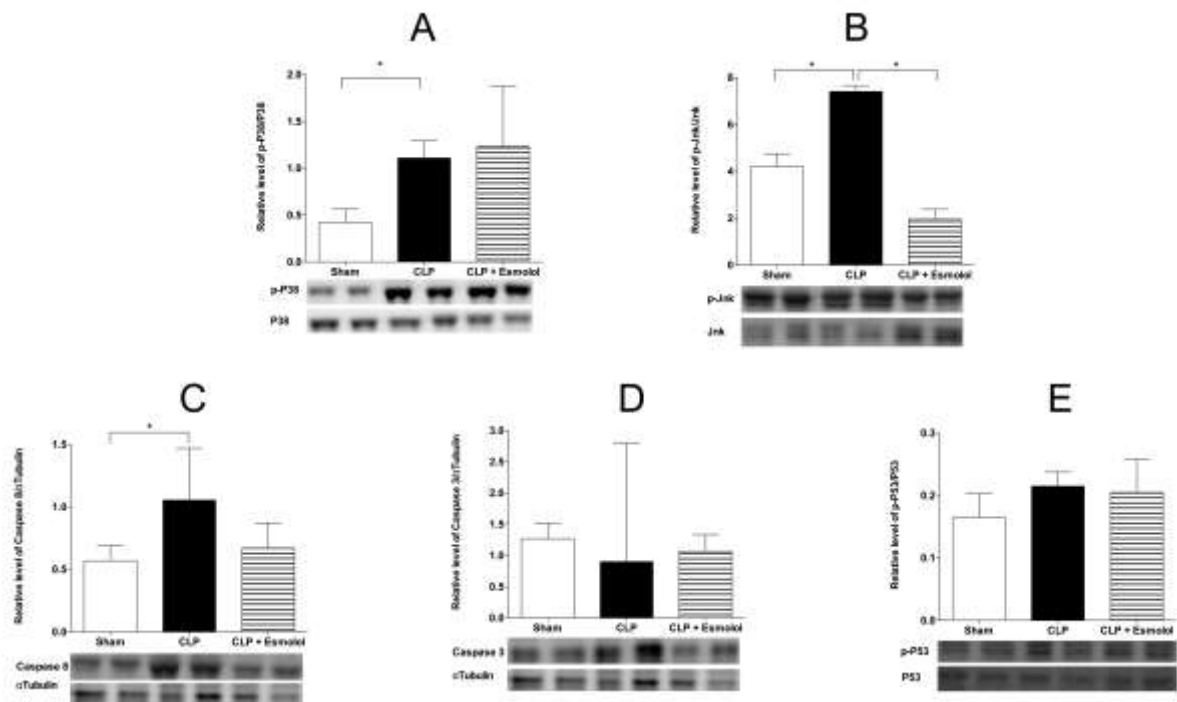


Figure S3: Western blot analysis of protein expression in abdominal aorta. Western blots revealing (A) phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase (p-p38), (B) phosphorylated Jun amino-terminal kinase (p-JNK), (C) caspase 8, (D) caspase 3 and (E) tumor protein p53 (P53) expression. Proteins are expressed in abdominal aorta lysates ( $n = 6$ ) from all groups of rats. A typical Western blot is shown below each histogram. Densitometric analysis was used to calculate the normalized protein ratio (protein to  $\alpha$  tubulin), which was set at 1 for the control group. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group. \* $P < 0.05$ . CLP: cecal ligation and puncture.

## **Annexe 6 : *I*f Channel Inhibition with Ivabradine does not Improve Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock**

SHOCK, Vol. xx, No. x, pp. 1–8, 2016

## I<sub>f</sub> CHANNEL INHIBITION WITH IVABRADINE DOES NOT IMPROVE CARDIAC AND VASCULAR FUNCTION IN EXPERIMENTAL SEPTIC SHOCK

Chaojie Wei,<sup>\*†</sup> Narimane Al Kattani,<sup>\*†</sup> Huguette Louis,<sup>†‡</sup> Eliane Albuissou,<sup>†§</sup>  
Bruno Levy,<sup>\*†¶</sup> and Antoine Kimmoun<sup>\*†¶</sup>

<sup>\*</sup>INSERM U 1116, Groupe Choc, Equipe 2, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France;

<sup>†</sup>Université de Lorraine, Nancy, France; <sup>‡</sup>INSERM U 1116, Groupe Choc, Equipe 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France; <sup>§</sup>Unité ESPRI-BioBase, CHRU Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France; and <sup>¶</sup>CHU Nancy, Service de Réanimation Médicale Brabois, Pole Cardiovasculaire et Réanimation Médicale, Hôpital Brabois, Vandoeuvre les Nancy, France

Received 17 Nov 2015; first review completed 2 Dec 2015; accepted in final form 10 Feb 2016

**ABSTRACT**—Objective: Previous studies have suggested that lowering heart rate (HR) by selective  $\beta$ 1-blockers improves sepsis-induced cardiac and vascular dysfunction primarily by decreasing proinflammatory pathways. However, the impact of isolated heart rate reduction (HRR) on hemodynamics and inflammatory pathways remains unknown. The present study was designed to assess the effects of HRR by ivabradine, an I<sub>f</sub> channel inhibitor, on cardiovascular function and inflammatory pathways in peritonitis-induced septic shock in rats. Design: Randomized animal study. Setting: University research laboratory. Interventions: Four hours after cecal ligation and puncture (CLP), Wistar rats were randomly allocated to the following groups: CLP (n = 8) and CLP+ivabradine (n = 8, administered *per os* 4 h after the surgery). Another eight Wistar male rats underwent sham operation. All rats received a continuous infusion of saline (10 mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), analgesic (nalbuphine: 0.2 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), and antibiotics (imipenem and cilastatin sodium: 10 mg kg<sup>-1</sup>) 4 h after the surgery. Assessment at 18 h included hemodynamics, *in vivo* cardiac function by echocardiography, and *ex vivo* vasoreactivity by myography. Circulating cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10) were measured by ELISA, whereas cardiac and vascular protein expressions of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ /iNOS and Akt/eNOS were assessed by Western blotting. Results: Compared with sham animals, CLP induced tachycardia, hypotension, decreased cardiac output, hyperlactatemia, and vascular hyporesponsiveness to vasopressors. Compared with the CLP group, adjunction of ivabradine decreased the HR without any impact on blood pressure, lactatemia, or vascular responsiveness to vasopressors. Adjunction of ivabradine to CLP rats had no impact on TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 cytokines, or on the protein expression levels of phosphorylated forms of NF- $\kappa$ B, Akt, eNOS, and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in cardiac and vascular tissues. Conclusion: Isolated HRR by ivabradine in an experimental model of septic shock does not appear to be associated with any effect on the tested parameters of cardiac function or on vascular responsiveness to vasopressors. Moreover, in this setting, ivabradine does not alter the circulating levels of selected pro/anti-inflammatory cytokines or cardiac and vascular NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression levels.

**KEYWORDS**—Heart function, heart rate reduction, inflammation, sepsis, vasoreactivity

### INTRODUCTION

Despite adequate initial resuscitation with fluids and catecholamines and after pain and fever control, some septic shock patients continue to display persistent tachycardia likely due to septic cardiomyopathy and/or autonomic dysregulation. In this instance, a heart rate (HR) more than 90 bpm is considered as an independent risk factor of mortality (1). Nevertheless, it remains unclear as to whether this tachycardia is only a marker of severity or, conversely, participates in the initiation of the proinflammatory process (2).

The dysfunction of the autonomic system is triggered and maintained by the massive release of proinflammatory cytokines occurring at the early phase of septic shock (3–6). It would therefore be of potential value to reduce this early proinflammatory release to avoid the onset of multiple organ

failure and death. One approach currently under assessment is the use of selective  $\beta$ 1-blockade (7–9). Experimental studies have shown that, in the early onset of septic shock, a selective  $\beta$ 1-blockade efficiently reduces HR and improves both cardiac and vascular functions. Most of these beneficial effects appear to be related to the downregulation of inflammatory pathways. Nevertheless, the negative inotropic effect of  $\beta$ 1-blockade restricts its prescription to those patients with apparent preserved cardiac function.

Moreover, when using  $\beta$ 1-blockade, the specific aspect of heart rate reduction (HRR) on cardiovascular function and inflammatory pathways remains poorly studied comparatively with anti-inflammatory effects (10–12). Consequently, it is unknown whether an isolated HRR may prevent sepsis-induced myocardial and vascular dysfunction in septic shock and whether this improvement involves a modulation of the inflammatory pathways.

Ivabradine is a pure HR-lowering drug and acts by selectively inhibiting the I<sub>f</sub> current channel, which governs the electrical pacemaker activity in the sino-atrial node. Ivabradine does not affect myocardial contractility or the sympathetic pathway, thus avoiding any interference with inotropic amines (13, 14).

The purpose of the present study was to determine the consequences of an isolated HRR on *in vivo* left ventricular

AQ1

AQ2

AQ4

AQ3 Address reprint requests to Bruno Levy, MD, PhD, CHU Nancy, Service de Réanimation Médicale Brabois, Pole Cardiovasculaire et Réanimation Médicale, Hôpital Brabois, Vandoeuvre les Nancy, France. E-mail: b.levy@chu-nancy.fr

AQ4 AK and BL received fees from Baxter. The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

AQ5 Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citation appears in the printed text and is provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.shockjournal.com).

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000593

Copyright © 2016 by the Shock Society

systolic function assessed by echocardiography; *ex vivo* vascular responsiveness to phenylephrine (Phe) and vascular relaxation to acetylcholine (ACh) of the thoracic aorta and mesenteric artery; and the eventual inflammatory pathways involved in these actions, using an experimental model of septic shock.

## METHODS

### Animals

**AQ6** Male Wistar rats (Janvier, France) weighing 300 to 400 g were investigated after an acclimation period of at least 1 week before experimentation. The French Animal Care Committee in keeping with European regulations approved all animal experimentation protocols.

### Shock model: cecal ligation and puncture

This model has previously been described in detail (15). Briefly, in isoflurane-anesthetized rats (induction: isoflurane 3.5% and maintenance: isoflurane 2%), a laparotomy was performed after which the cecum was ligated just below the ileo-cecal valve and punctured with an 18-gauge needle, followed by extrusion of cecal contents. For sham-operated rats, the cecum was exteriorized without ligation or puncture. The cecum was thereafter reinserted into the abdomen and the incision closed by suture. A catheter was concurrently inserted in the left external jugular vein and tunneled subcutaneously to the back of the neck where it was attached to a swivel device. Four hours after the experiment, all rats received a continuous infusion of saline, analgesic (nalbuphine 0.2 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), and anti-infective therapy (imipenem and cilastatin sodium 10 mg kg<sup>-1</sup>). Infusion rate was fixed at 10 mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### Experimental design

Four hours after cecal ligation and puncture (CLP), Wistar rats were randomly allocated to either the CLP (n=8) or CLP+ivabradine (n=8, administered *per os* 4 h after the surgery) group. Rats that underwent sham operation were allocated to the sham group. Assessment was performed 18 h after surgery.

### Echocardiography procedure

Hemodynamic investigation was initiated 18 h after surgery. Rats were anesthetized with 1.5% isoflurane using 100% oxygen for echocardiographic assessment (12 MHz linear-array probe at an image depth of 2 cm on an HP Sonos 5500 Imaging System; Philips Medical Systems, Andover, MA). Ascending aortic diameter (AD) was obtained at systole from the left parasternal long-axis view. Ejection fraction (EF) was defined from left ventricular end systolic and end diastolic dimensions measured in short-axis view at the level of the papillary muscles in M mode. Aortic velocity time integrate (VTI) was defined from the apical five-chamber view. HR was calculated from the time interval period (T) between two maximum peak velocities (HR = 60/T). Stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were calculated with the following formulas: SV = VTI × AD<sup>2</sup>/4 and CO = HR × SV, respectively. All measurements were averaged on three consecutive cardiac cycles. Mean arterial pressure was measured by a blood pressure transducer (Emka, Paris, France) through the left carotid artery. Lactate concentrations were determined using a Statstrip Lactate Xpress Meter (Nova Biomedical, Flintshire, UK).

### Ivabradine dosage

The aim was to reduce the HR by approximately 20% at 18 h after the onset of CLP. Given the absence of prior description for the administration of ivabradine in septic shock rats, a preliminary study was first performed involving 20 normal rats randomized into five groups to determine the adequate dosage of ivabradine in this setting. Rats in each group received a different dosage of ivabradine, namely 0, 0.3, 0.6, 1, and 5 mg kg<sup>-1</sup> administered by gavage. HR was measured using the BP-2000 Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems, Apex, NC) at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, and 18 h. Five mg kg<sup>-1</sup> of gavage-administered ivabradine allowed a maximum median HRR of 27% [min 24–max 28] and a minimum of 13% [min 8–max 21] over an 18-h period (see Figure S1, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A379>). This dosage was thus subsequently tested in 20 CLP rats randomized into four groups: ivabradine administered 3 h before onset of CLP, immediately at onset, 4 h after onset, and CLP group without ivabradine. HR was calculated in each group by echocardiography at 18 h after the onset of CLP. The time interval between two maximum peaks of velocity was used to

calculate HR (HR = 60/time interval). Five mg kg<sup>-1</sup> administered by gavage 4 h after the onset of CLP allowed a reduction in median HR of 22.2% (see Figure S2, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A379>). Based on these results, 5 mg kg<sup>-1</sup> ivabradine administered by gavage was ultimately chosen for subsequent studies.

### Vascular reactivity procedure

After sacrifice of the animals by exsanguination under isoflurane, the thoracic aorta and mesenteries were removed and their vasoreactivity studied. Vascular reactivity of thoracic aorta and small mesenteric artery (SMA) rings (radius 200–400 μm) was studied on a wire myography (Danish Myo Technology, Arhus, Denmark) as previously described (16). The experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution with the following composition (in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 14.9 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5.5 glucose, continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. After a 20-min equilibration period under optimal passive tension, two successive contractions in response to the combination of KCl depolarization (80 mM) and Phe (10 μM) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used to test the maximal contractile capacity of the vessels. After a 20-min washout period, concentration-response curves to Phe were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (1 nM to 100 μM) to determine the same concentration producing an equal level of contraction in the different groups. To study endothelium-dependent relaxation, small mesenteric rings with functional endothelium were precontracted with Phe (10 μM) and then exposed to increasing incremental concentrations of ACh (1 nM to 100 μM; Sigma, St Louis, MO).

### Cytokine analyses

Plasma levels of TNF-α, IL-6, and IL-10 were measured in duplicate with the use of rat TNF-α, IL-6, and IL-10 ELISA kits (Quantikine ELISA; R&D Systems Europe, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as picograms of the measured cytokine per milliliter of plasma.

### Western blotting

Thoracic aorta and heart were homogenized, lysed, and proteins (25 μg) separated on 10% SDS-PAGE. Blots were probed with the following antibodies: anti-iNOS (Abcam, Paris, France), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) (rabbit anti-rat eNOS, phosphorylated [Ser1177]; Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France), phosphorylated-Akt (p-Akt) (rabbit anti-rat Akt, phosphorylated [Ser473]; Cell Signaling Technology), Akt (Akt-pan [C67E7]; Cell Signaling Technology), phosphorylated NF-κB (Phospho-NF-κB p65 [Ser536] [93H1]; Cell Signaling Technology), IκBα [44D4] (Cell Signaling Technology), and β-actin [13E5] (Cell Signaling Technology). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes after which bound antibodies were detected with a secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI). The blots were visualized using an enhanced chemiluminescence system (ECL Plus; Amersham, GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France).

### Statistical analysis

Results are expressed as median with minimum and maximum values, interquartile range, and 95% confidence intervals (CIs) using bootstrapping based on 1,000 bootstrap samples (median [min–max]; interquartile range; 95% CI) and in figures as median with upper edges of error bars representing the 75th percentile. Because of the small sample size, all analyses were performed with nonparametric methods. A Kruskal-Wallis test was used on all 24 rats to determine whether the three independent samples stemmed from a population with a common median. When the Kruskal-Wallis test was significant at the 5% level, post hoc comparisons were performed using Dunn's multiple-comparisons procedure between sham and CLP and CLP and CLP+ivabradine. The nonlinear curve-fitting tool of PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA) was used to depict the results of vasoreactivity testing. The two-tailed statistical significance level was set at 0.05. Statistical analyses were performed using IBM-SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY) and GraphPad Software 6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

## RESULTS

### Model characterization

Compared with sham animals, CLP induced tachycardia (sham: 369 bpm [349–418] vs. CLP: 425 bpm [402–467];

$P = 0.053$ ), arterial hypotension (sham: 109 mmHg [104–120] vs. CLP: 80 mmHg [75–96];  $P = 0.009$ ), and hyperlactatemia (sham: 1.3 mmol L<sup>-1</sup> [0.8–1.7] vs. CLP: 2.4 mmol L<sup>-1</sup> [1.9–3.3];  $P = 0.004$ ) (Table 1). Compared with sham animals, SV (sham: 253  $\mu$ L [199–302] vs. CLP: 127  $\mu$ L [71–186];  $P = 0.007$ ) and CO (sham: 92 mL min<sup>-1</sup> [75–112] vs. CLP: 54 mL min<sup>-1</sup> [30–77];  $P = 0.024$ ) were decreased in CLP animals.

Although Phe induced a dose-dependent increase in tension in isolated aorta and SMAs in sham rats, CLP conversely blunted the Phe-induced contraction (sham vs. CLP,  $P < 0.05$ , both aorta and SMA) (Fig. 1, panels A and C). ACh produced a concentration-dependent relaxation of isolated aorta and small mesenteric vessels in sham animals, whereas vascular responses to ACh were decreased in isolated aorta and SMAs from CLP rats (sham vs. CLP;  $P < 0.05$  for both aorta and SMA) (Fig. 1, panels B and D).

#### Hemodynamic effects following ivabradine therapy in CLP animals

Adjunction of ivabradine induced a decrease in HR in CLP animals (CLP: 425 bpm [402–467] vs. CLP+ivabradine: 343 bpm [269–368];  $P = 0.0001$ ) while having no effect on either mean arterial pressure (CLP: 80 mmHg [75–96] vs. CLP+ivabradine: 75 mmHg [58–87];  $P > 0.05$ ), SV (CLP: 127  $\mu$ L [71–186] vs. CLP+ivabradine: 105  $\mu$ L [61–195];  $P > 0.05$ ), or hyperlactatemia (CLP: 2.4 mmol L<sup>-1</sup> [1.9–3.3] vs. CLP+ivabradine: 2.5 mmol L<sup>-1</sup> [2.0–3.7];  $P > 0.05$ ). Owing to ivabradine-induced HRR, CO was also decreased although did not reach statistical significance (CLP: 54 mL min<sup>-1</sup> [30–77] vs. CLP+ivabradine: 33 mL min<sup>-1</sup> [16–72];  $P > 0.05$ ).

Vascular responsiveness to Phe and ACh was similar in CLP and CLP+ivabradine animals for both aorta and mesenteric artery ( $P > 0.05$ ) (Fig. 1, panels A–D).

#### Effect of ivabradine on circulatory inflammatory mediators

Compared with the sham group, CLP was associated with increased plasma levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 ( $P < 0.05$ ). Adjunction of ivabradine in CLP animals did not influence these circulatory inflammatory cytokines (Fig. 2).

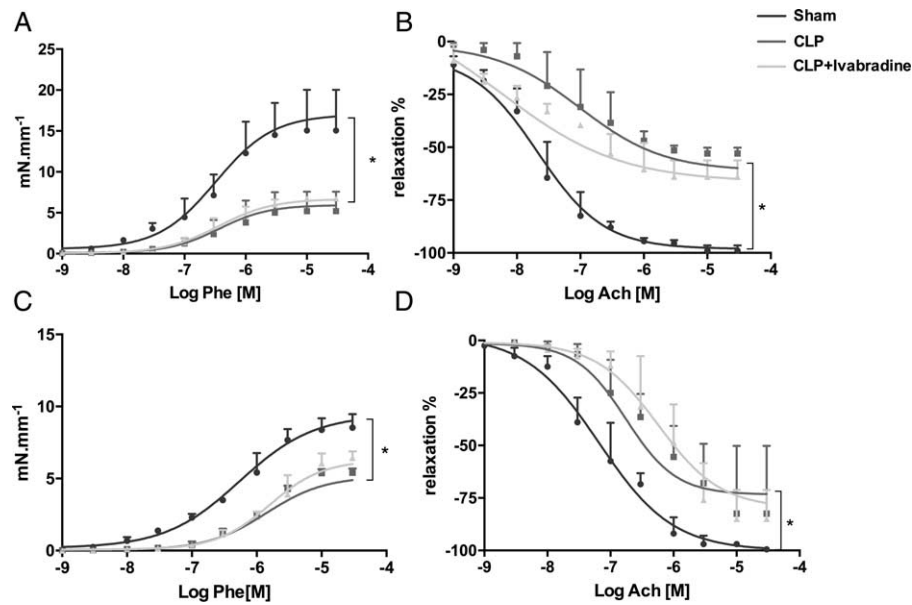
#### Effect of ivabradine on CLP-induced inflammatory pathways in cardiac and vascular tissues

In both heart and thoracic aorta, CLP was associated with a significant increase in expression levels of iNOS, phosphorylated NF- $\kappa$ B, and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  comparatively with sham animals (heart iNOS expression level: sham vs. CLP,  $P = 0.016$ ; heart phosphorylated NF- $\kappa$ B: sham vs. CLP,  $P = 0.004$ ; heart I $\kappa$ B $\alpha$  expression level: sham vs. CLP,  $P = 0.044$ ; aorta iNOS expression level: sham vs. CLP,  $P = 0.010$ ; aorta phosphorylated NF- $\kappa$ B: sham vs. CLP,  $P = 0.013$ ; aorta I $\kappa$ B $\alpha$  expression level: sham vs. CLP,  $P = 0.044$ ), whereas p-eNOS-to-eNOS ratio and p-Akt/Akt ratio were decreased in CLP animals compared with the sham group (heart p-eNOS-to-eNOS ratio: sham vs. CLP,  $P = 0.019$ ; heart p-Akt/Akt ratio: sham vs. CLP,  $P = 0.013$ ; aorta p-eNOS-to-eNOS ratio: sham

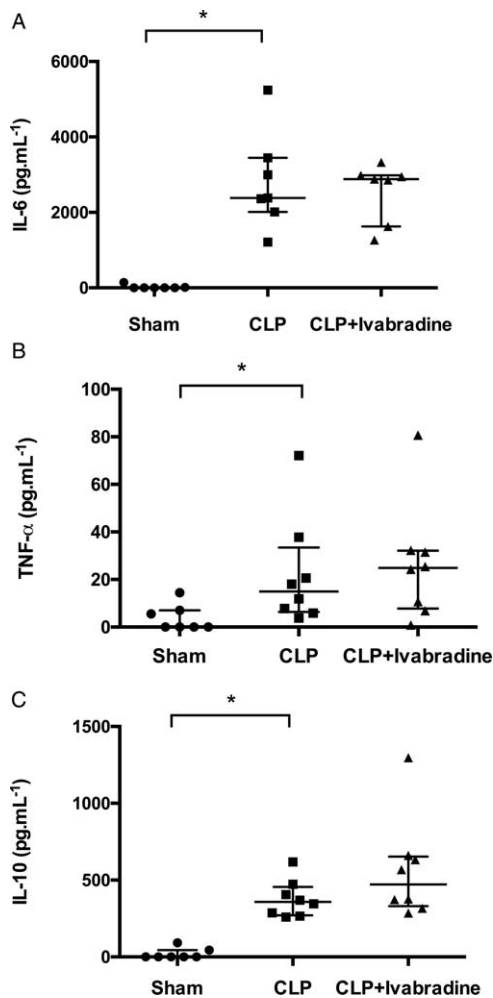
TABLE 1. Comparison of echocardiographically measured hemodynamic characteristics 18 h after CLP in all three rat groups

Variables	Sham n = 8			CLP n = 8			CLP+ivabradine n = 8			P	Post hoc P
	Median	Minimum-maximum interquartile range	Median 95% CI	Median	Minimum-maximum interquartile range	Median 95% CI	Median	Minimum-maximum interquartile range	Median 95% CI		
	Heart rate, min <sup>-1</sup>	369	349–418	355–413	425	402–467	415–450	343 <sup>b</sup>	269–368		
Mean arterial pressure, mmHg	109	104–120	105–120	80 <sup>a</sup>	75–96	75–83	75	58–87	64–84	0.0003	0.009: sham vs. CLP
Stroke volume, $\mu$ L	253	199–302	214–280	127 <sup>a</sup>	8	95–170	105	18	76–126	0.0004	0.007: sham vs. CLP
Cardiac output, mL min <sup>-1</sup>	92	75–112	87–107	54 <sup>a</sup>	30–77	44–72	33	16–72	25–45	0.0002	0.024: sham vs. CLP
Ejection fraction, %	87	84–89	84–88	91 <sup>a</sup>	9	87–96	92	83–99	85–95	0.0568	
Lactatemia, mmol L <sup>-1</sup>	1.3	0.8–1.7	0.8–1.5	2.4 <sup>a</sup>	1.9–3.3	2.0–3.0	2.5	2.0–3.7	2.2–3.1	0.0004	0.004: sham vs. CLP

Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. When significant at the 5% level, post hoc comparisons were performed using Dunn's multiple-comparisons procedure between a: sham vs. CLP and b: CLP vs. CLP+ivabradine. CLP, cecal ligation and puncture.



**FIG. 1.** *Ex vivo* vascular responsiveness to phenylephrine and concentration-response curves to acetylcholine in thoracic aorta and mesenteric resistance arteries ( $n = 8/\text{group}$ ). Panels A and C: Contraction of the vessel (in  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ ) as a function of increasing concentrations of phenylephrine (Phe) expressed as log of phenylephrine [M]. Panels B and D: Relaxation of the vessel (in %) as a function of increasing concentrations of acetylcholine (Ach) expressed as log of acetylcholine [M]. Contraction and relaxation were not improved in the CLP+ivabradine group compared with the CLP group. The symbols (circles, squares, and triangles) represent median, whereas upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group. \*Sham vs. CLP,  $P < 0.05$ . CLP, cecal ligation and puncture.



vs. CLP,  $P = 0.016$ ; aorta p-Akt/Akt ratio: sham vs. CLP,  $P = 0.036$ ). Adjunction of ivabradine to CLP animals did not influence this inflammatory pattern (Figs. 3 and 4).

## DISCUSSION

The main result of this study is that isolated HRR by ivabradine in an experimental septic shock model is not associated with any improvement in cardiac or vascular functions. Moreover, HRR appears to have no impact on the assessed inflammatory pattern in this acute setting.

### Model characteristics

In this study, we deliberately used an experimental design that closely mimics the setting usually observed at bedside. All animals presented a severe septic shock and were resuscitated 4 h after the surgery with adapted antibiotics and fluids. In this model, all CLP animals displayed the typical pattern of septic shock, including hypotension, low CO, hyperlactatemia, and vascular hyporesponsiveness to catecholamines (17). To avoid any interference with the adrenergic system, catecholamines were not administered in this study.

**FIG. 2.** Assessment of circulatory pro/anti-inflammatory cytokine levels of (A) IL-6, (B) TNF- $\alpha$ , and (C) IL-10 as measured by ELISA. Data are expressed as concentration ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), whereas the black lines indicate medians  $\pm$  interquartile range. Sham,  $n = 7$ ; CLP,  $n = 8$ ; CLP+ivabradine,  $n = 8$ . For IL-6, both the CLP and CLP+ivabradine groups had one value which exceeded the standard curve and were therefore excluded from the statistical analysis. \*Sham vs. CLP,  $P < 0.05$ . CLP, cecal ligation and puncture.



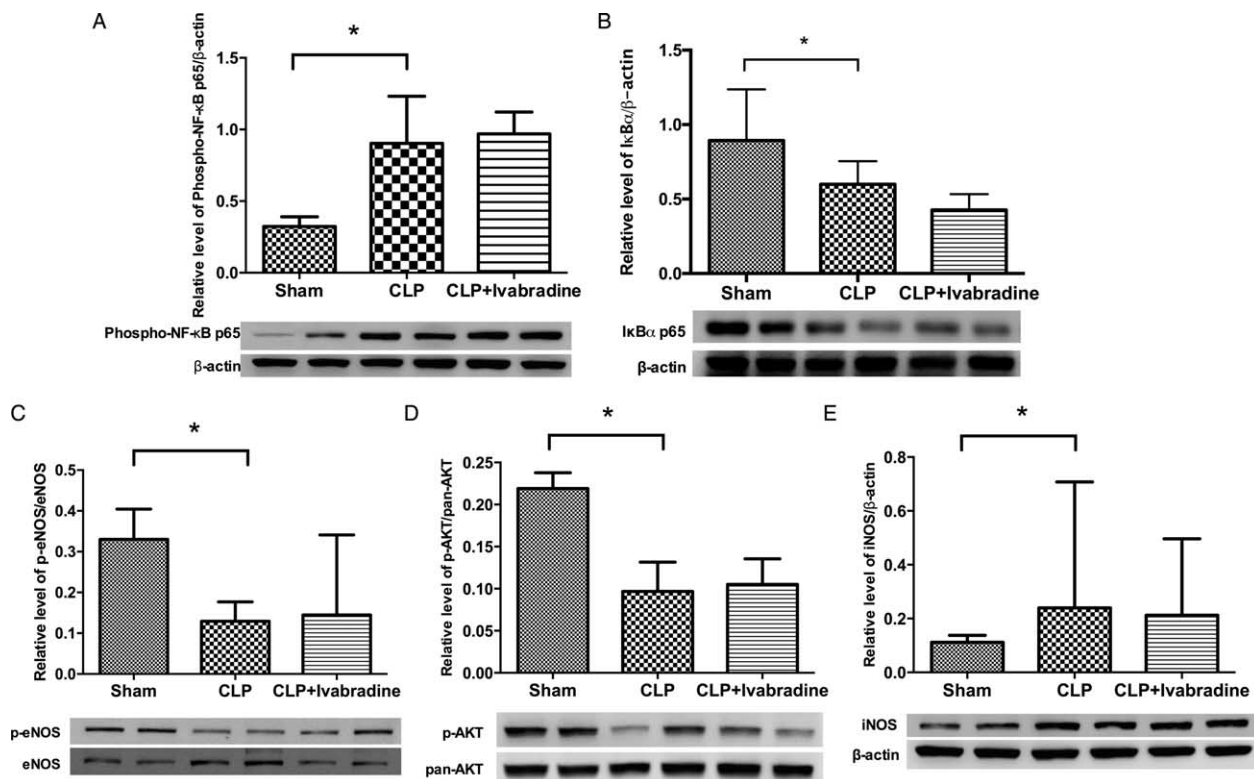


FIG. 3. Western blot analysis of protein expression in heart. Western blots revealing (A) nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), (B) nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ), (C) phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), (D) phosphorylated Akt (p-AKT), and (E) inducible nitric oxide synthase (iNOS). Proteins are expressed in heart lysates (n = 8) prepared from all rat groups. A typical Western blot is shown below each histogram. Densitometric analysis (n = 8) was used to calculate the normalized protein ratio. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group. \*Sham vs. CLP,  $P < 0.05$ . CLP, cecal ligation and puncture.

Moreover, low concentrations of isoflurane were deliberately used to minimize the impact of anesthesia on cardiac and vascular functions (18).

#### Isolated HRR by ivabradine does not improve cardiac or vascular function

In septic patients, hemodynamic alterations are partly the consequence of an impaired modulation of the sympathetic system on cardiac and vascular tissues (19). In this setting, persistent tachycardia or new-onset supraventricular tachyarrhythmia, representing an excess in sympathetic activation, are independent factors of poor outcome (20–23). In the present experimental model, ivabradine efficiently reduced HR, confirming a previous study (24). Nevertheless, this HRR was not associated with any positive effect on cardiac function or on the vascular responsiveness to vasopressors. There is no experimental literature to date on specific heart reduction by ivabradine in septic shock with persistent tachycardia. Other than  $\beta$ -blockers, current literature is also scarce relative to this topic regarding other therapies such as digoxin or amiodarone (25). Only one preliminary case study reported the results of HRR by ivabradine in three patients who developed septic shock after cardiac surgery in whom ivabradine achieved HRR with no adverse hemodynamic events (26). Finally, a randomized and open label trial comparing ivabradine versus placebo is currently ongoing in critically ill patients with multiple organ failure and contraindications to  $\beta$ -blockade therapy and in

which the primary endpoint is solely the proportion of patients with a reduction in HR (NCT: 01186783) (27). However, preliminary data have also emerged regarding the potential benefit of lowering HR in other shock states such as dobutamine-treated cardiogenic shock. For instance, specific HRR may be of potential benefit in avoiding dobutamine-induced tachycardia and thus only retain the inotropic effects of this drug (28).

#### Isolated HRR by ivabradine does not exert any impact on inflammatory patterns

A reduction in HR is one of the rationales for the administration of selective  $\beta$ 1-blockade in septic shock patients with persistent tachycardia despite adequate resuscitation (29). The impact of HRR is unknown as opposed to the largely described specific anti-inflammatory effects of  $\beta$ 1-blockade (10–12, 30). Given this unknown impact, the consequences of specific HRR on the main pathways involved in cardiac and vascular dysfunctions during septic shock were hence investigated in the present study, in which results revealed no influence of HRR on inflammation in the current model of septic shock. However, a recently published experimental study conducted in the particular setting of myocardial ischemia-reperfusion syndrome demonstrated an HR-independent effect of ivabradine on infarct size. This benefit appeared to be mediated by reduced reactive oxygen species formation and increased ATP production in cardiac cells (31).

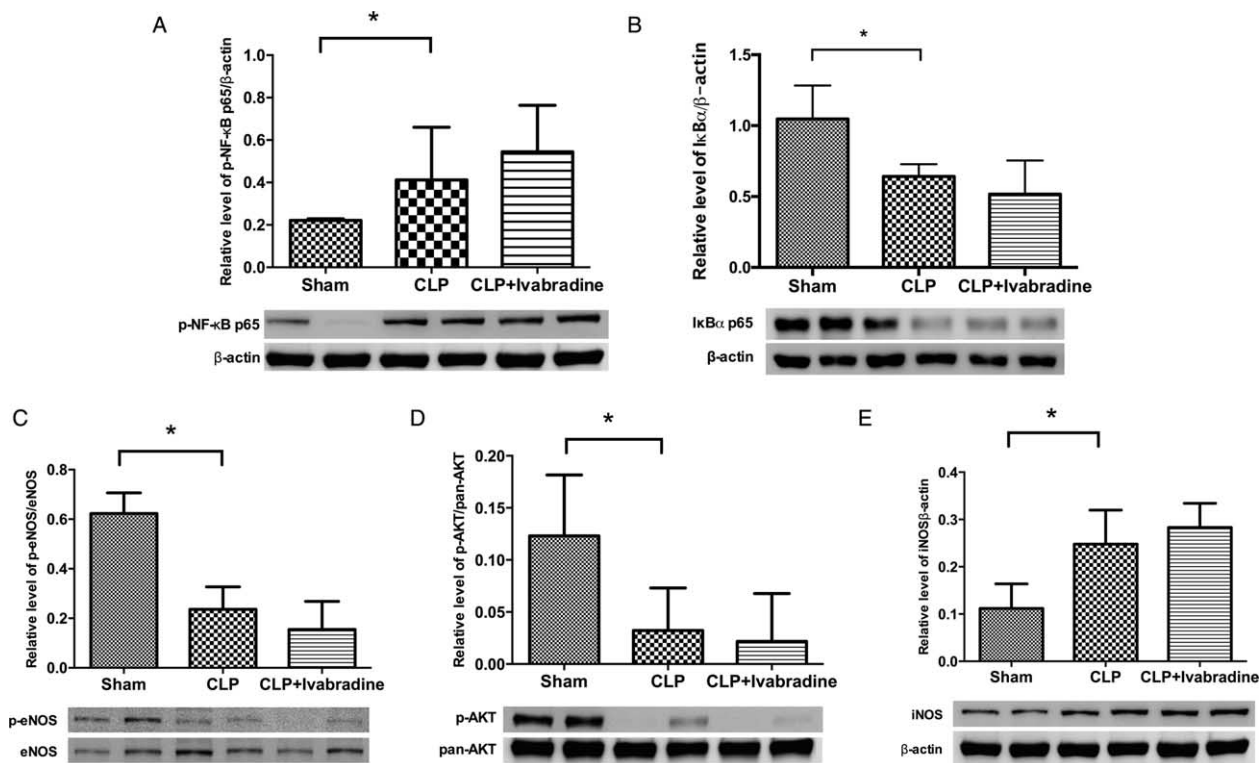


FIG. 4. Western blot analysis of protein expression in thoracic aorta. Western blots revealing (A) nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), (B) nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha ( $I\kappa B\alpha$ ), (C) phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), (D) phosphorylated Akt (p-AKT), and (E) inducible nitric oxide synthase (iNOS). Proteins are expressed in thoracic aorta lysates ( $n = 8$ ) prepared from all rat groups. A typical Western blot is shown below each histogram. Densitometric analysis ( $n = 8$ ) was used to calculate the normalized protein ratio. Data are expressed as median  $\pm$  interquartile range deviation. Upper edges of error bars represent the 75th percentile in each group. \*Sham vs. CLP,  $P < 0.05$ . CLP, cecal ligation and puncture.

### Limitations of the study

In our model, CLP animals displayed some degree of hypovolemia despite massive fluid resuscitation ( $10 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  during 14 h representing approximately 10 L of fluids for a 70 kg individual). In this instance, the increase in HR is primarily an adaptive mechanism to maintain CO. Considering this degree of hypovolemia, the reduction in HR by ivabradine could appear counterintuitive and is far from usual bedside management that includes individually adapted fluid treatment, vasopressors, or inotropes (32).

Cardiac function was assessed by echocardiography together with EF and CO. Although echocardiography revealed no effect of ivabradine on cardiac function, intrinsic inotropism, independently of pre- and postload, was not assessed. Nevertheless, it is unlikely that ivabradine might have improved intrinsic load-independent cardiac function and did not improve at least in part other hemodynamics parameters. Moreover, the specific role of other inflammation pathways were not investigated, such as those involving reactive oxygen species in ischemia-reperfusion syndrome, that may have been modulated by adjunction of ivabradine (33). However, the absence of NF- $\kappa$ B variation appears not to sustain such hypothesis. Finally, it would have been of potential interest to compare, in this experimental model of septic shock, a CLP group treated with ivabradine with another CLP group treated with a  $\beta$ 1-adrenergic receptor antagonist, which is known to exert both HRR and anti-inflammatory effects. However, such  $\beta$ 1-adrenergic

antagonism has already been investigated in a number of previous studies (10–12).

### CONCLUSION

Results of the present study demonstrate that, in an experimental septic shock model, isolated HRR with ivabradine has seemingly no beneficial impact on either echocardiographically assessed cardiovascular functions, *ex vivo* vasoreactivity, or investigated inflammatory pathways. Consequently, isolated control of HR does not appear to be a promising therapy in septic shock. Thus, further investigations are warranted to determine whether lower doses of  $\beta$ -blockers which do not reduce HR have a beneficial impact on cardiovascular organ functions and inflammatory patterns in septic shock.

### REFERENCES

- Hoke RS, Muller-Werdan U, Lautenschlager C, Werdan K, Ebel H: Heart rate as an independent risk factor in patients with multiple organ dysfunction: a prospective, observational study. *Clin Res Cardiol* 101:139–147, 2012.
- Magder SA: The ups and downs of heart rate. *Crit Care Med* 40:239–245, 2012.
- Pancoto JA, Correa PB, Oliveira-Pelegrin GR, Rocha MJ: Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci* 138:57–63, 2008.
- Schulte A, Lichtenstern C, Henrich M, Weigand MA, Uhle F: Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *J Surg Res* 188:480–488, 2014.
- Papaioannou VE, Dragoumanis C, Theodorou V, Gargaretas C, Pneumatikos I: Relation of heart rate variability to serum levels of C-reactive protein,

- interleukin 6, and 10 in patients with sepsis and septic shock. *J Crit Care* 24:625e1–6257e, 2009.
6. Tateishi Y, Oda S, Nakamura M, Watanabe K, Kuwaki T, Moriguchi T, Hirasawa H: Depressed heart rate variability is associated with high IL-6 blood level and decline in the blood pressure in septic patients. *Shock* 28:549–553, 2007.
  7. Hamzaoui O, Teboul JL: The role of beta-blockers in septic patients. *Minerva Anesthesiol* 81:312–319, 2015.
  8. Rudiger A: Beta-block the septic heart. *Crit Care Med* 38:S608–S612, 2010.
  9. de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D: Bench-to bedside review: beta-adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 13:230, 2009.
  10. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV: Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 38:388–394, 2010.
  11. Kimmoun A, Louis H, Al Kattani N, Delemazure J, Dessales N, Wei C, Marie PY, Issa K, Levy B: beta1-adrenergic inhibition improves cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Crit Care Med* 43:e332–e340, 2015.
  12. Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J: Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* 33:2294–2301, 2005.
  13. Dias da Silva VJ, Tobaldini E, Rocchetti M, Wu MA, Malfatto G, Montano N, Zaza A: Modulation of sympathetic activity and heart rate variability by ivabradine. *Cardiovasc Res* 108:31–38, 2015.
  14. Du XJ, Feng X, Gao XM, Tan TP, Kiriazis H, Dart AM: I(f) channel inhibitor ivabradine lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities. *Br J Pharmacol* 142:107–112, 2004.
  15. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH: Cecal ligation and puncture. *Shock* 24(suppl 1):52–57, 2005.
  16. Kimmoun A, Ducrocq N, Sennoun N, Issa K, Strub C, Escanye JM, Leclerc S, Levy B: Efficient extra- and intracellular alkalization improves cardiovascular functions in severe lactic acidosis induced by hemorrhagic shock. *Anesthesiology* 120:926–934, 2014.
  17. Ducrocq N, Kimmoun A, Furmaniuk A, Hekalo Z, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Levy B: Comparison of equipressor doses of norepinephrine, epinephrine, and phenylephrine on septic myocardial dysfunction. *Anesthesiology* 116:1083–1091, 2012.
  18. Riha H, Papousek F, Neckar J, Pirk J, Ostadal B: Effects of isoflurane concentration on basic echocardiographic parameters of the left ventricle in rats. *Physiol Res* 61:419–423, 2012.
  19. Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P: Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med* 160:458–465, 1999.
  20. Leibovici L, Gafter-Gvili A, Paul M, Almasreh N, Tacconelli E, Andreassen S, Nielsen AD, Frank U, Cauda R: Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality. *QJM* 100:629–634, 2007.
  21. Kuipers S, Klein Klouwenberg PM, Cremer OL: Incidence, risk factors and outcomes of new-onset atrial fibrillation in patients with sepsis: a systematic review. *Crit Care* 18:688, 2014.
  22. Sander O, Welters ID, Foex P, Sear JW: Impact of prolonged elevated heart rate on incidence of major cardiac events in critically ill patients with a high risk of cardiac complications. *Crit Care Med* 33:81–88, 2005.
  23. Edul VS, Enrico C, Laviolle B, Vazquez AR, Ince C, Dubin A: Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. *Crit Care Med* 40:1443–1448, 2012.
  24. Scheruebel S, Koyani CN, Hallstrom S, Lang P, Platzer D, Machler H, Lohner K, Malle E, Zorn-Pauly K, Pelzmann B: I(f) blocking potency of ivabradine is preserved under elevated endotoxin levels in human atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 72:64–73, 2014.
  25. Worthley LI, Holt AW: Digoxin in the critically ill patient. *Crit Care Resusc* 1:252–264, 1999.
  26. De Santis V, Frati G, Greco E, Tritapepe L: Ivabradine: a preliminary observation for a new therapeutic role in patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Clin Res Cardiol* 103:831–834, 2014.
  27. Nuding S, Ebel H, Hoke RS, Krummnerl A, Wienke A, Muller-Werdan U, Werdan K: Reducing elevated heart rate in patients with multiple organ dysfunction syndrome by the I(f) (funny channel current) inhibitor ivabradine: MODI (f)Y trial. *Clin Res Cardiol* 100:915–923, 2011.
  28. Gallet R, Ternacle J, Damy T, Guendouz S, Bremont C, Seemann A, Gueret P, Dubois-Rande JL, Lim#P: Hemodynamic effects of Ivabradine in addition to dobutamine in patients with severe systolic dysfunction. *Int J Cardiol* 176:450–455, 2014.
  29. Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, Orecchioni A, D'Egidio A, D'Ippoliti F, Raffone C, et al.: Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA* 310:1683–1691, 2013.
  30. Mori K, Morisaki H, Yajima S, Suzuki T, Ishikawa A, Nakamura N, Innami Y, Takeda J: Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function. *Intensive Care Med* 37:1849–1856, 2011.
  31. Kleinbongard P, Gedik N, Witting P, Freedman B, Klocker N, Heusch G: Pleiotropic, heart rate-independent cardioprotection by ivabradine. *Br J Pharmacol* 172:4380–4390, 2015.
  32. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, et al.: Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 41:580–637, 2013.
  33. Beytur A, Binbay M, Sarihan ME, Parlakpinar H, Polat A, Gunaydin MO, Acet A: Dose-dependent protective effect of ivabradine against ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney Blood Press Res* 35:114–119, 2012.



**SHK**

Manuscript No. 15-00507

**SHOCK**

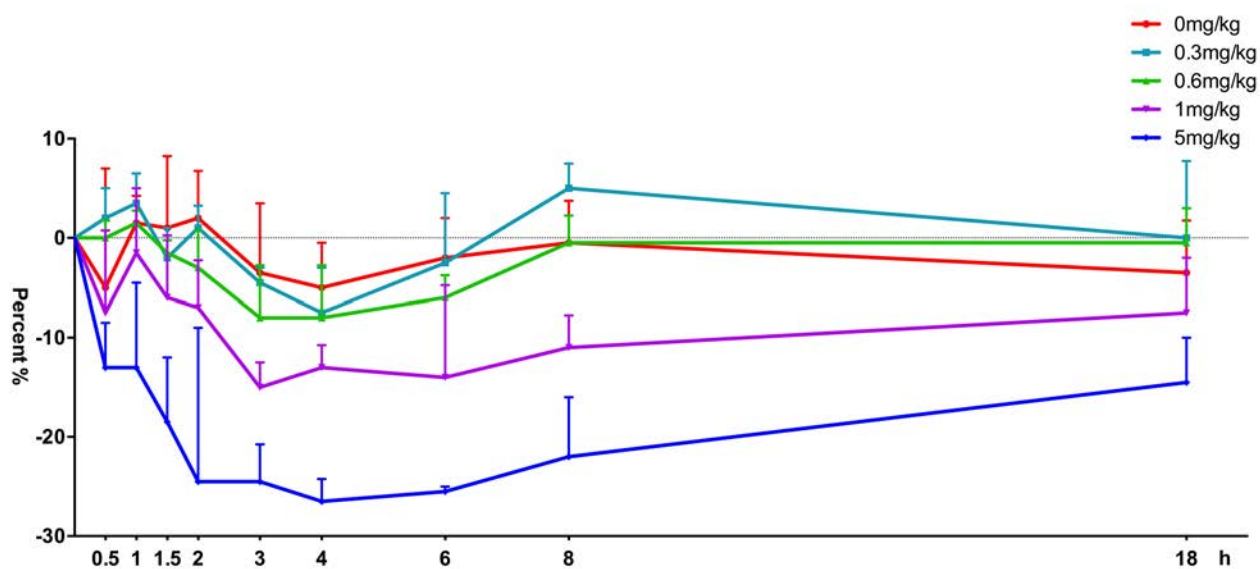
Dear Author,

During the preparation of your manuscript for typesetting, some queries have arisen. These are listed below. Please check your typeset proof carefully and mark any corrections in the margin as neatly as possible or compile them as a separate list. This form should then be returned with your marked proof/list of corrections to the Production Editor.

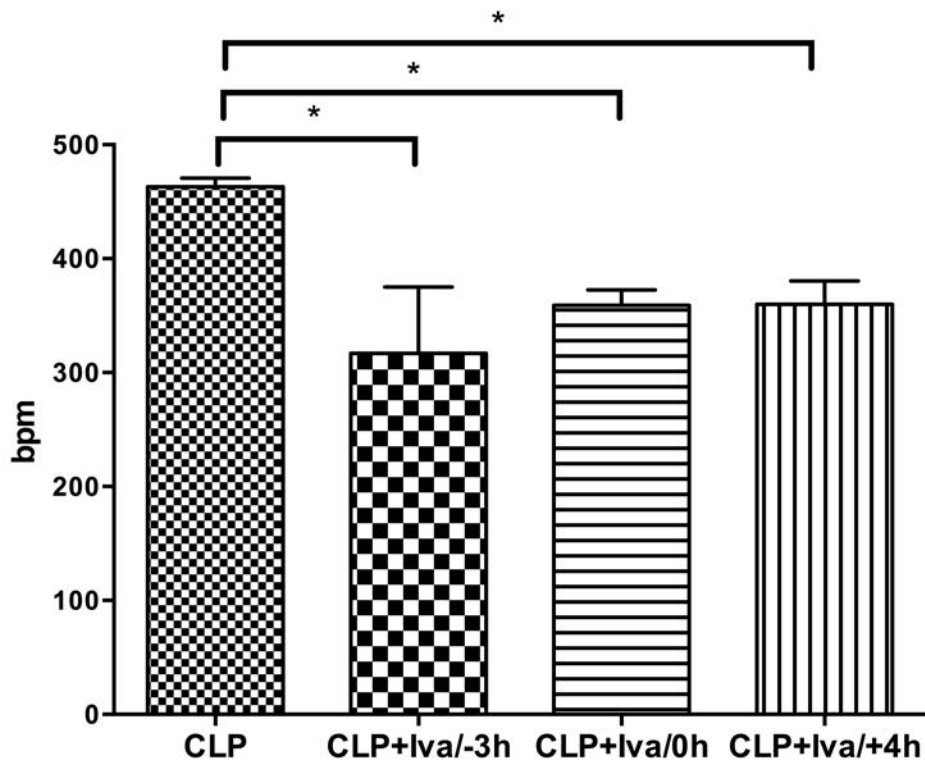
## QUERIES: to be answered by AUTHOR

QUERY NO.	QUERY DETAILS	RESPONSE
<AQ1>	Please confirm whether surnames/family names (red) have been identified correctly in the author byline.	
<AQ2>	Please check the affiliation for correctness.	
<AQ3>	Please check correspondences details for appropriateness.	
<AQ4>	“nalbuphin” has been changed to “nalbuphine.” Please check and confirm.	
<AQ5>	Please verify the accuracy of the conflicts of interest statements.	
<AQ6>	Heading “METHODOLOGY” has been changed to “METHODS.” Please check and confirm.	
<AQ7>	Please check the changes made in all the figure captions for correctness.	
<AQ8>	Please check the changes made in Table 1 for correctness.	

## Supplemental material



**Figure S1. Time-course dose response curve of heart rate after administration of Ivabradine in normal rats.** Heart rate was measured using the BP 2000 system at the indicated time points after administration of each indicated concentration of Ivabradine. Data represent the median and interquartile range (n=4) expressed as the reduced percentage relative to the initial heart rate.



**Figure S2. Effect of Ivabradine on heart rate in septic rats.** Ivabradine (Iva) was administered three hours before (CLP+Iva/-3h), immediately (CLP+Iva/0h) or four hours (CLP+Iva/+4h) after CLP. Heart rate was measured by echocardiography at 18 hours after onset of CLP. Data are expressed as median and interquartile range (n=5). \*Significant difference compared with the CLP group (P<0.05).

**Annexe 7 : Protocole Esmosepsis.**

# Protocole de Recherche Clinique

Avis favorable du CPP Est III 17/06/2013  
Autorisation de l'ANSM le 13/06/2013

Version N°2.0 du 31/01/2014

N°EUDRACT : 2012-004532-32

Code Promoteur : PSS 2012/ESMOSEPSIS-LEVY/SR

## ***Effets anti-inflammatoires et cardioprotecteur de l'esmolol dans le choc septique. Etude ESMOSEPSIS***

<b>Promoteur</b> Centre Hospitalier Universitaire de Nancy Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny 54035 NANCY Cedex	
<b>Investigateur Coordonnateur</b> Pr Levy Bruno Réanimation Médicale Brabois CHU Nancy brabois 54511 Vandoeuvre les Nancy Tel 0383154469 blevy@sfr.fr	<b>Investigateur associé</b> Pr Losser Marie-Reine Service de réanimation chirurgicale CHU Nancy brabois 54511 Vandoeuvre les Nancy Tél. : . 0383157400 Email : mr.losser@chu-nancy.fr
<b>Méthodologie - CIC Institut du coeur</b> Dr Fay Renaud Biostatistiques CIC-Plurithématique INSERM-CHU Pierre Drouin Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux Louis Mathieu 4, rue du Morvan 54 500 VANDOEUVRE-LES-NANCY  Tél :        33 (0)3 83 15 73 17 (bureau) 33 (0)3 83 15 73 20 (secrétariat) Fax :        33 (0)3 83 15 73 24  E-mail : r.fay@chu-nancy.fr	<b>Responsable de la recherche agissant pour le compte du promoteur / et autorisé à signer le protocole et ses modifications éventuelles au nom du promoteur :</b>  Direction de la Recherche et de l'Innovation O .de PESQUIDOUX- Directeur de la Recherche et de l'Innovation Hôpitaux de Brabois Tour Drouet 6 <sup>ème</sup> étage Rue du Morvan 54035 NANCY Cedex



---

## SOMMAIRE

1. RESUME DU PROTOCOLE.....	5
2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE.....	11
2.1 Résumé de la problématique de l'étude.....	11
2.2 Description de la population à étudier.....	14
2.3 Déclaration de conformité au protocole, aux bonnes pratiques cliniques et à la réglementation en vigueur.....	15
2.4 Dénomination et description du médicaments de l'essai .....	15
2.5 Résumé des résultats des essais non cliniques et des essais cliniques disponibles et pertinent au regard de la recherche concernée.....	16
2.6 Résumé des bénéfices, le cas échéant et des risques prévisibles et connus pour les personnes se prêtant à la recherche.....	18
3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	20
3.1 Hypothèses cliniques.....	20
3.2 Objectifs .....	21
4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE.....	21
4.1. Enoncé précis des critères d'évaluation principaux ET, le cas échéant, des critères d'évaluation secondaires .....	21
4.2. Description de la méthodologie de la recherche.....	23
4.3. Description des mesures prises pour réduire et éviter les biais.....	28
4.4. Médicament expérimental : esmolol (Brevibloc®).....	28
4.5. Durée prévue de participation des personnes et description de la chronologie et de la durée de toutes les périodes de l'essai .....	30
4.6. Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire.....	30
4.7. Collection d'échantillons biologiques.....	31
5. CRITERES DE SELECTION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE.....	32
5.1 Critères d'inclusion.....	32
5.2 Critères de non inclusion.....	32
6. EVALUATION DE LA SECURITE.....	33
6.1 Description des paramètres d'évaluation de la sécurité.....	33
6.2 Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de la sécurité.....	34
6.3 Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des évènements indésirables.....	35
6.4 Procédure de déclaration des EIG.....	36
6.5 Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'évènements indésirables.....	38

---

6.6 Rapports de sécurité.....	39
7. STATISTIQUES.....	39
8. DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES.....	40
9. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALTE.....	41
10. CONSIDERATION LEGALES ET ETHIQUES.....	42
10.1 Demande d'autorisation auprès de l'ANSM.....	43
10.2 Demande d'avis au Comité de Protection des Personnes.....	43
10.3 Modifications.....	43
10.4 Déclaration CNIL.....	44
10.5 Note d'information et Consentement éclairé.....	45
10.6 Rapport final de la recherche.....	45
11. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE.....	46
12. ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE.....	47
12.1. Assurance.....	47
12.2 Engagement scientifique.....	47
13. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION.....	47
14. BIBLIOGRAPHIE.....	47
15. LISTE DES ANNEXES .....	54

---

## Liste des abréviations

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
ARC	Attaché de Recherche Clinique
BPC	Bonnes Pratiques Cliniques
CIC-P	Centre d'Investigation Clinique – Plurithématique
CPP	Comité de Protection des Personnes
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CRF	Case Report Form (cahier d'observation)
DRI	Direction de la Recherche et de l'Innovation
EIG	Evènement Indésirable Grave
EIGI	Effet Indésirable Grave Inattendu
FE	Fraction d'éjection
Fc	Fréquence cardiaque
Ic	Index cardiaque
ICG	Indocyanine green (Vert d'indocyanine)
ICH	International Conference on Harmonization (Conférence internationale pour l'harmonisation)
IGS	Indice de gravité simplifié
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
MR	Méthodologie de Référence
NF $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NIRS	Near-infrared spectroscopy
OPS	Orthogonal polarization spectral
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PAM	Pression Artérielle Moyenne
PAS	Pression Artérielle Systolique
PVC	Pression veineuse centrale
RASS	Richmond Agitation Sedation Scale
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
RVSI	Résistances vasculaires systémiques indexées
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
VESI	Volume d'éjection systolique indexé

## RESUME

Titre	<i>Effets anti-inflammatoires et cardioprotecteurs de l'esmolol dans le choc septique. Etude ESMOSEPSIS</i>
Nb de centres	Un centre, deux services
Type d'étude	Etude sur un médicament, ouverte, pilote, de phase II, monocentrique, interventionnelle
Justification / contexte	<p>Malgré des progrès thérapeutiques constants, le choc septique et le sepsis sévère s'accompagnent toujours d'une mortalité élevée. Le système <math>\beta</math> adrénergique, fortement activé au cours du sepsis, est un modulateur clé de la réponse inflammatoire et de la fonction d'organe. Le blocage <math>\beta_1</math> et la stimulation <math>\beta_2</math> atténuent la réponse proinflammatoire agressive de la phase initiale septique en modulant la réponse cytokinique macrophagique. Les <math>\beta_1</math> bloquants semblent prévenir également la dysfonction myocardique septique, diminuent les besoins du myocarde en oxygène sans altérer la perfusion générale des autres organes, et améliorent la variabilité cardiovasculaire. Un blocage <math>\beta_1</math> et une stimulation <math>\beta_2</math> semblent avoir un effet bénéfique sur la dysfonction d'organe du sepsis, et des études expérimentales ont montré un gain de survie. En conséquence, la modulation fine de la balance <math>\beta_1/\beta_2</math> adrénergique apparaît comme un nouvel objectif thérapeutique prometteur dans le traitement du sepsis sévère et du choc septique.</p> <p>Au cours du choc septique expérimental, l'esmolol (Brévilbloc®), bêtabloquant cardiosélectif, module l'inflammation. Il diminue la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et l'expression de certaines molécules d'adhésions. Sa tolérance hémodynamique est démontrée chez le gros animal. La plupart des études expérimentales réalisées avaient pour objectif de diminuer la fréquence cardiaque de 20%. A cette occasion, l'effet anti-inflammatoire</p>

	<p>était significatif et parfois associé à une amélioration de la survie. L'esmolol a été utilisé chez l'homme en phase tardive du choc septique mais pas à la phase précoce. Il n'a montré aucun effet délétère dans cette indication.</p>
Objectif principal	<p>Décrire et comparer la valeur moyenne de l'index cardiaque avant/après l'administration d'esmolol, titré pour une baisse de 20 % de la fréquence cardiaque chez des patients en état de choc septique.</p>
Objectifs secondaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Décrire et comparer la valeur moyenne de la posologie de noradrénaline avant/après administration d'esmolol titré pour une baisse de 20 % de la fréquence cardiaque chez des patients en état de choc septique.</li> <li>• Décrire l'effet de l'esmolol sur la dysfonction ventriculaire appréciée par échocardiographie.</li> <li>• Etudier l'effet de l'esmolol sur les paramètres de circulation régionale et microcirculatoires (clairance ICG par Limon, NIRS, OPS sub-lingual).</li> <li>• Etudier les corrélations entre les données hémodynamiques et les marqueurs biologiques de l'agression (dosages plasmatiques de cytokines pro et anti-inflammatoires).</li> </ul>
Critère de jugement principal	<p>Le critère de jugement principal est la valeur de l'index cardiaque, exprimé en l/min/m<sup>2</sup>, mesuré à différents temps : H0-H1-H2-H3-H4-H5 et H6.</p>
Critères de jugement secondaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dose de noradrénaline nécessaire pour maintenir la Pression artérielle moyenne</li> <li>• Présence d'une dysfonction ventriculaire définit à l'aide des paramètres d'échocardiographie présentés dans le paragraphe 4.2.2.1</li> <li>• Paramètres de circulation régionale et microcirculatoires :</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paramètres obtenus par la technologie NIRS</li> <li>- clairance ICG par Limon exprimé en mL/min</li> <li>- Paramètres obtenus par la technologie OPS Sublingual</li> </ul>
<p>Méthodologie / schéma de l'étude</p>	<p>Après inclusion, un premier bilan décrit comme H0, comprendra un point hémodynamique complet (PiCCO, échographie, NIRS, clairance ICG, OPS sublingual) et un point biologique dont une partie est spécifique à l'étude (cytokines).</p> <p>Une titration de l'esmolol sera alors réalisée.</p> <p>L'esmolol sera alors perfusé à la posologie minimale de 25 µg/kg/min. La dose sera incrémentée par palier de 25 µg/kg/min toutes les 5 min. La dose d'entretien maximale est de 200 µg/kg/min.</p> <p>La perfusion sera maintenue pendant 6 heures.</p> <p>Un point sur l'état clinique du patient sera fait au terme de chaque heure de suivi.</p> <p>Au bout de ces 6 heures, un nouveau bilan sera réalisé (bilan H6) identique au bilan de H0 et la perfusion sera arrêtée.</p> <p>Compte tenu de la demi-vie brève du produit, les paramètres hémodynamiques devraient se normaliser en 10 minutes.</p> <p>Enfin, un appel téléphonique sera réalisé à J28 afin d'obtenir le statut vital du patient.</p>
<p>Critères d'inclusion des sujets</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hommes ou femmes d'âges ≥ 18 ans,</li> <li>• Présentant un choc septique,</li> <li>• Patient mis en condition (cathéter artériel, cathéter veineux central avec PVC et Picco) indépendamment du protocole,</li> <li>• Remplissage optimisé (delta PP, épreuve de lever de jambe passif négatifs)</li> <li>• Score SOFA ≥ 3 calculé à l'inclusion (Annexe 6),</li> <li>• Index cardiaque &gt; 3 l/min/m<sup>2</sup> et fréquence cardiaque &gt; 100 b/min</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patient ayant donné un consentement libre, éclairé et par écrit. A défaut, le consentement sera obtenu auprès d'un membre de la famille, s'il est présent. Dès que possible, le patient sera informé et son consentement lui sera demandé pour la poursuite éventuelle de la recherche.</li> <li>• Etre inscrit au régime de Sécurité Sociale</li> </ul>
Critères de non-inclusion des sujets	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antécédents d'asthme sévère</li> <li>• Antécédents de bronchopneumopathie chronique obstructive sévère,</li> <li>• Antécédents de bloc auriculo-ventriculaire de 2e ou du 3e degré non appareillé</li> <li>• Maladie du sinus auriculaire non appareillée</li> <li>• Troubles graves de la conduction auriculo ventriculaire sans stimulateur cardiaque</li> <li>• Insuffisance cardiaque chronique « sévère » définie par une fraction d'éjection préalable &lt;40%,</li> <li>• Choc cardiogénique</li> <li>• Bradycardie inférieure à 50 battements par minute</li> <li>• Hypotension persistante sous noradrénaline</li> <li>• Hypersensibilité aux bêtabloquants, ou à l'un des excipients</li> <li>• Angor de Prinzmetal,</li> <li>• Phéochromocytome non traité,</li> <li>• Traitement en cours par antagonistes du calcium (bépridil, diltiazem et vérapamil)</li> <li>• Altération de la fonction ventriculaire gauche (FE &lt;40%) à l'exclusion de la cardiomyopathie septique</li> <li>• Acidose métabolique avec pH&lt;7.2</li> <li>• Hypertension pulmonaire</li> <li>• Grossesse évolutive</li> <li>• Patient mineur</li> <li>• Limitation thérapeutique</li> </ul>

Nombre de sujets nécessaires/ plus petite différence détectable	Etude pilote. Le recrutement de 25 patients permettra de conclure avec une puissance de 80% à un effet significatif au seuil bilatéral de 5% pour une variation $\geq 0,6$ déviation standard de l'index cardiaque entre H0 et H6. D'après une série de 31 patients en choc septique de profil identique hospitalisés dans notre service, une telle différence correspondrait à une variation de 0.6 l/min/m <sup>2</sup> de l'index cardiaque, de 2,5% de la FE et de 0.5 µg/kg/min de la posologie de noradrénaline. L'évolution des paramètres entre H0 et H6 sera analysée à l'aide du test de Student pour séries appariées si l'hypothèse de normalité des distributions peut être acceptée, par le test des différences couplées de Wilcoxon dans le cas contraire.
Durées	Durée de participation de chaque patient : 28 jours Durée de la période d'inclusion : 18 mois Durée totale de l'étude: 24 mois
Procédures d'investigation différences par rapport a la prise en charge habituelle	Le monitoring hémodynamique et microcirculatoire est fait en pratique quotidienne au service et ne sera pas modifié par l'essai. Les échocardiographies sont également faites en routine. Procédures spécifiques à l'étude : Administration d'esmolol (BREVIBLOC®) Prélèvements supplémentaires ; deux prélèvements veineux à H0 et à H6, de chacun 2 tubes.
Actes nécessitant de la logistique	Stockage de BREVIBLOC® dans le service Gestion des prélèvements sanguins (CIC-P)
Evaluation des bénéfices et des risques liés a la recherche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bénéfice individuel</b> : les patients bénéficieront de la prise en charge habituelle de réanimation et d'un suivi rapproché de la tolérance hémodynamique et cardiovasculaire de l'esmolol.</li> <li>• <b>Bénéfice collectif</b> : Cette étude vise à améliorer la prise en charge du choc septique et en particulier la mortalité qui lui est associée.</li> <li>• <b>Risque individuel</b> : L'esmolol (BREVIBLOC®) ayant une demi-vie très courte (9 minutes), tout effet secondaire hémodynamique sera réversible en quelques minutes et potentiellement traitable par augmentation transitoire de la noradrénaline. Les données publiées jusqu'alors (32, 33, 45) semblent</li> </ul>



	<p>indiquer un très bon profil de sécurité avec notamment une stabilité hémodynamique remarquable.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Risque collectif</b> : le risque immédiat lié à l'administration d'esmolol sera suivi en temps réel par l'ensemble du dispositif de réanimation nécessaire à la prise en charge de patients en situation de choc septique. Toute augmentation inattendue de la tolérance sur le plan hémodynamique, cardiaque ou autre fera l'objet d'une rediscussion de la balance bénéfice/risque.</li> <li>• <b>Balance bénéfice/risque</b> : L'effet bénéfique attendu de l'esmolol, dans ce contexte de milieu de réanimation ne semble pas, au vu des données de tolérance actuelle, être remis en cause par le risque associé à son administration. La balance bénéfice/risque est positive sur cette étude.</li> </ul>
Analyse statistique	CIC-P
Retombées attendues	Monter une étude clinique randomisée en double aveugle de survie dans le choc septique
Financement	<p>Ce projet est financé par un budget de 20 000 euros dans le cadre d'un CPRC.</p> <p>Don financier du Laboratoire Baxter afin d'acheter les poches d'esmolol nécessaires au projet.</p> <p>Le reste des dépenses sera pris en charge par l'Association des Chefs de Service.</p>

## 2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE

### 2.1 RESUME DE LA PROLEMATIQUE DE L'ETUDE

Au cours du sepsis, la survenue d'une défaillance cardio-vasculaire fait passer la mortalité de 40 à 60% [1]. La réaction inflammatoire secondaire à ce type d'agression induit une libération de nombreuses cytokines. La plupart d'entre elles ont des effets cardio-dépresseurs [2-5] et pourraient favoriser l'apparition d'altérations microcirculatoires [6]. Elles altèrent la transduction  $\beta$ -adrénergique [7] en activant massivement la synthèse d'oxyde nitrique (NO) [8] et de péroxynitrite [9] et favorisent la survenue d'une dysfonction mitochondriale [10]. Le processus d'apoptose est également augmenté et amplifie la baisse de la contractilité myocardique [11-12]. Comme dans l'insuffisance cardiaque non septique, l'inadaptation du débit cardiaque provoque une hyper-activation sympathique associée à une augmentation de la concentration de catécholamines circulantes [13]. Ceci entraîne une diminution rapide de la densité des adrénocepteurs  $\beta$  [14-15] et stimule des phénomènes pro-apoptotiques par une voie  $\beta_1$  [16]. Compte tenu de cette physiopathologie commune avec l'insuffisance cardiaque non septique, les effets positifs sur la morbi-mortalité [17] observés avec les  $\beta$  bloquants dans cette pathologie pourraient être également retrouvés dans la cardiomyopathie septique.

Parallèlement, à cet effet cardioprotecteur « direct », les  $\beta$  bloquants modulent l'inflammation. Des récepteurs adrénergiques ont été identifiés au niveau des cellules de l'immunité suggérant que le système nerveux autonome participe à la régulation de l'inflammation [18]. Comme au niveau myocardique, l'activation de ces récepteurs par les catécholamines libérées au cours du sepsis oriente la cellule vers tel ou tel caractère de fonctionnement. Au niveau des cellules de l'immunité, la population de récepteurs  $\beta_2$  est considérée comme prédominante. Jusqu'à très récemment leur activation était considérée comme exclusivement anti-inflammatoire [19]. Cependant, certains contingents de récepteur  $\beta_2$  pourraient avoir une action pro-inflammatoire [20-21]. Quant aux récepteurs  $\beta_1$ , ils sont également présents sur les monocytes humains, et exercent une action exclusivement pro-inflammatoire [22].

L'analyse de la variabilité cardiovasculaire a confirmé le lien entre l'activité du système nerveux autonome et le niveau d'inflammation. Chez le lapin, un challenge endotoxinique diminue la variabilité cardio-vasculaire témoignant d'une atteinte du système nerveux autonome [23]. Chez l'homme, l'intensité de l'inflammation est inversement proportionnelle à la diminution de la variabilité cardiovasculaire [24-25] à expliquer/complexe. Au cours du choc septique, cette altération de la variabilité de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque survient très précocement [26]. Sa récupération est associée à un pronostic favorable [26]. A l'inverse, une persistance de ces altérations est associée à un pronostic très péjoratif [27].

Les relations qui existent entre l'activité adrénérgique et l'inflammation ont justifié de tester l'effet des  $\beta$ -bloquants au cours du sepsis. Initialement, l'utilisation d'un  $\beta$ -bloquants non sélectifs, dans un modèle de sepsis murin, était associée à une augmentation de la mortalité [28]. L'effet anti-inflammatoire était inconstant et des phénomènes pro-apoptotiques étaient présents [28-29]. Ces résultats s'expliquent par les différences d'orientation fonctionnelle de la cellule, engendrés par les blocages  $\beta_2$  et/ou  $\beta_1$ . Le blocage  $\beta_2$  favorise une orientation pro-inflammatoire [28] et pro-apoptotique [16]. Alors que le blocage  $\beta_1$  est associé à un effet anti-inflammatoire constant [30-32] parfois associé à une amélioration du pronostic [30]. Ainsi, l'utilisation d'un  $\beta_1$  sélectif diminue l'inflammation  $\beta_1$  dépendante [22] tout en conservant l'effet anti-inflammatoire  $\beta_2$  [18]. Il améliore également la contractilité myocardique [32]. Récemment, dans un modèle de sepsis endotoxémique particulièrement sévère, l'utilisation d'un  $\beta_1$  bloquant sélectif, l'esmolol (Brevibloc®), avec un objectif de baisse de la fréquence cardiaque de 20% était associée à une amélioration du remplissage ventriculaire et à une tolérance macro-hémodynamique satisfaisante [33].

Chez l'homme, les  $\beta$  bloquants ont été testés dans de nombreuses situations hyperadrénérgiques. Chez les victimes de brûlures étendues, ils limitent le catabolisme protéique [34]. En période péri-opératoire ou chez les patients traumatisés, ils participent à la régulation de l'inflammation et améliorent le pronostic. En réanimation, un traitement préalable par  $\beta$  bloquant serait associé à une amélioration de la survie quelque soit la pathologie ayant justifié l'hospitalisation [35]. Cet effet est plus important lorsque le  $\beta$  bloquant est cardio-sélectif. Un effet positif est également observé chez les patients hospitalisés pour insuffisance respiratoire aigüe [36] et

insuffisance cardiaque aigue [37]. Enfin au cours du choc septique, une étude préliminaire a montré que l'utilisation d'un  $\beta$ 1 bloquant était bien tolérée sur le plan hémodynamique [38].

Dans le service de réanimation, 3 patients présentant un choc septique traité par de fortes doses de noradrénaline et compliqué de tachycardie sinusale induisant une dysfonction diastolique gauche, ont été traités par de l'esmolol (indication princeps de l'esmolol). L'effet de l'esmolol est résumé dans le tableau suivant :

		Noradrénaline $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$	PAM mmHg	Fc b/min	Ic l/min/m-2	VESI ml/m-2	RVSI
Patient 1	Pré traitement	0,9	72	133	3,3	25	18
	Esmolol	0,9	68	117	2,93	25	19
Patient 2	Pré traitement	1,2	75	142	3,8	26	17
	Esmolol	1,2	70	120	3,8	32	16
Patient 3	Pré traitement	1,5	69	139	4,2	30	14
	Esmolol	1,5	71	122	3,6	30	17

VESI : volume d'éjection systolique indexé

RVSI : résistances vasculaires systémiques indexées

Pour résumer, l'esmolol a permis une disparition des signes échographiques de dysfonction diastolique gauche (VESI et RVSI), sans variation de la pression artérielle significative et une baisse de l'index cardiaque (Ic) proportionnelle à la baisse de la fréquence cardiaque (Fc) dans deux tiers des cas et une amélioration du volume d'éjection systolique chez un patient par amélioration du remplissage gauche.

Ces données sont maintenant confirmées à plus grande échelle par des expériences publiées sous forme d'abstract et montrant l'innocuité hémodynamique de l'esmolol. Une étude a montré une amélioration significative de la mortalité (Morelli et al, congrès ISICEM 2012).

## **2.2 DESCRIPTION DE LA POPULATION A ETUDIER**

Les patients inclus seront les patients hospitalisés en réanimation médicale et réanimation chirurgicale du CHU de NANCY pour la prise en charge d'un choc septique. Le sepsis est défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique associé à un foyer infectieux documenté ou très probable. Le sepsis sévère correspond au tableau précédant compliqué de signes d'hypoperfusion ou de dysfonction d'organes (Annexe 1). Le choc septique est un sepsis sévère nécessitant un traitement par vasopresseur.

25 patients en choc septique traités par noradrénaline seront inclus dans l'étude.

### Modalité de recrutement :

Les patients admis en réanimation chirurgicale et réanimation médicale présentant les critères d'éligibilité et aucun critère de non inclusion seront inclus dans l'étude, jusqu'à obtention de l'effectif prévu. Comme décrit dans l'article L.1122-1.2 du Code de la Santé Publique, l'inclusion ne sera effective qu'après signature du consentement par le patient ou par un membre de sa famille ou par la personne de confiance, désignée par le patient selon l'article L.1111-6 du Code de la Santé Publique.

En l'absence de membre de la famille ou de la personne de confiance, si le patient ne peut donner son consentement par lui-même, l'investigateur inclura le patient dans l'étude et recueillera le consentement de la personne de confiance le plus rapidement possible.

## **2.3 DECLARATION DE CONFORMITE AU PROTOCOLE, AUX BONNES PRATIQUES CLINIQUES ET A LA REGLEMENTATION EN VIGUEUR**

Le promoteur et tout investigateur s'engagent à réaliser cette étude selon les recommandations de la déclaration d'Helsinki et ses révisions, les dispositions de la Directive européenne 2001/20-CE telle que transposée en droit Français par les lois 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique et 2004-800 du 06 août 2004 relative à la bioéthique et des décrets d'application, et suivre les recommandations des Bonnes Pratiques Cliniques.

Ils s'engagent à respecter toutes dispositions législatives et réglementaires dont pourrait relever la recherche.

## **2.4 DENOMINATION ET DESCRIPTION DU MEDICAMENTS DE L'ESSAI**

### **2.4.1 JUSTIFICATION DU CHOIX DU BETABLOQUANT**

L'esmolol est un  $\beta$  bloquant cardio-sélectif administré par voie intraveineuse, inhibant préférentiellement les récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques, tout en évitant l'augmentation des résistances vasculaires périphériques. Il est dépourvu d'activité sympathomimétique intrinsèque significative et d'effet stabilisant de membrane aux doses thérapeutiques. Sa demi-vie de distribution est très rapide (environ 2 minutes) et sa demi-vie d'élimination est d'environ 9 minutes. Ces caractéristiques, associées à la surveillance hémodynamique continue, permettront d'assurer une sécurité optimale pour les patients. C'est avec ce  $\beta$  bloquant que les travaux expérimentaux ont montré une bonne tolérance hémodynamique au cours du choc septique dans un modèle de gros animal [33] et des effets favorables sur la réponse inflammatoire et la survie (travail en cours de publication). Il possède également une activité anti-inflammatoire importante au cours du choc septique [32].

### **2.4.2 MEDICAMENT A L'ETUDE**

Le médicament à l'étude est l'esmolol (BREVIBLOC®, BaxterSAS, France).

Ce médicament est autorisé depuis le 13/09/2001 et commercialisé depuis le 14/12/2005.

Le document de référence de l'étude est le RCP mis à jour. Ce RCP n'est pas encore disponible sur le site de l'ANSM mais il a reçu l'autorisation de l'ANSM en date du 27 septembre 2012.

**DCI : Esmolol.**

**Nom Commercial : BREVIBLOC® 10 mg/ml sol pour perfusion, poche de 250ml**

Composition :

Chlorhydrate d'esmolol .....10 mg pour 1 ml de solution pour perfusion.  
pH = 4,5 à 5,5.

*Excipients* : Chlorure de sodium, acétate de sodium trihydraté, acide acétique glacial, hydroxyde de sodium ou acide chlorhydrique, eau pour préparations injectables. Poches en plastique polyoléfine.

## **2.5 RESUME DES RESULTATS DES ESSAIS NON CLINIQUES ET DES ESSAIS CLINIQUES DISPONIBLES ET PERTINENT AU REGARD DE LA RECHERCHE CONCERNEE**

### **2.5.1 Essais non cliniques**

Suzuki et al (32) ont testé, après randomisation, l'effet d'une perfusion d'esmolol sur la survie de 19 rats en situation de choc septique (par ligature et perforation caecale) (groupe esmolol n=10, groupe témoin n=9). Le groupe esmolol a reçu une perfusion de 15 mg/kg/heure). Le groupe témoin a reçu du sérum salé. La survie dans le groupe esmolol était significativement plus longue par rapport au groupe témoin ( $69.5 \pm 26.8$  heures versus  $28.6 \pm 11.0$  heures). Les taux de TNF intrapéritonéaux étaient significativement diminués dans le groupe esmolol ( $16.8 \pm 10.7$  versus  $5.4 \pm 7.1$  pg/ml,  $P < 0.05$ ). Les auteurs concluaient que le traitement bêta1bloquant améliorait l'évolution du sepsis en agissant possiblement sur la muqueuse intestinale et sur la réponse inflammatoire locale.

Aboab et al.(33) ont testé de façon randomisée l'esmolol en perfusion continue chez 10 porcs anesthésiés en situation de choc hémodynamique (administration IV de

lipopolysaccharide). La perfusion d'esmolol avait été titrée pour obtenir une diminution de la fréquence cardiaque de 20%. Dans le groupe esmolol, l'index cardiaque a diminué de 9% à 180 minutes et de 2% à 300 minutes. Dans le groupe témoin (administration de sérum salé), l'index cardiaque avait diminué de 14% à 180 minutes et de 27% à 300 minutes. Les auteurs ne mettaient pas en évidence de différences hémodynamiques significatives entre les 2 groupes excepté au niveau de la résistance vasculaire systémique (SVR) ( $p=0,017$ ). Ceci leur permettait de conclure que chez les gros animaux en situation de choc endotoxémique, l'administration d'une perfusion d'esmolol titrée pour obtenir une diminution de la fréquence cardiaque de 20% était bien tolérée et pouvait permettre de compenser une dysfonction cardiaque par un effet de précharge positif.

### 2.5.2 Essai cliniques

Dans le domaine du choc septique, il n'existe à l'heure actuelle que très peu de données sur l'utilisation de l'esmolol, raison pour laquelle nous avons qualifié cette recherche en phase 2, type « tolérance et proof of concept ».

Un article dans une revue allemande a récemment été en faveur de l'innocuité de l'administration d'esmolol chez des patients en choc septique (45) : Après correction de la précharge, l'administration d'un bolus d'esmolol (0,2-0,5 mg/kg) suivie d'une perfusion pendant 24 heures a été réalisée chez des patients en état septique en situation de tachycardie sinusale ou supraventriculaire. Les patients ayant une dysfonction ventriculaire gauche sévère étaient exclus ainsi que les patients en bloc auriculoventriculaire ou nécessitant des doses de noradrénaline supérieures à 0,5 mg/kg/min. Dix patients ont ainsi été inclus. La fréquence cardiaque est passée d'une valeur moyenne de 142 +/- 11 bpm à 112 +/-9 bpm ( $p<0,001$ ) avec une diminution parallèle (mais non significative) de l'index cardiaque ( $4,94 \pm 0.76$  à  $4.35 \pm 0.72$  l/min/m<sup>2</sup>). Les auteurs concluaient que la diminution de 30 bpm n'avait pas d'impact sur l'hémodynamique globale et que l'administration d'un bêtabloquant pouvant faire l'objet d'une titration était bien tolérée et permettait un effet cardioprotecteur chez des patients à haut débit cardiaque en situation de choc septique.



## 2.6 RESUME DES BENEFICES, LE CAS ECHEANT ET DES RISQUES PREVISIBLES ET CONNUS POUR LES PERSONNES SE PRETANT A LA RECHERCHE

- **Bénéfice individuel** : les patients bénéficieront de la prise en charge habituelle de réanimation et d'un suivi rapproché de la tolérance hémodynamique et cardiovasculaire de l'esmolol.
- **Bénéfice collectif** : Cette étude vise à améliorer la prise en charge du choc septique et en particulier la mortalité qui lui est associée.
- **Risque individuel** : L'esmolol (BREVIBLOC®) ayant une demi-vie très courte (9 minutes), tout effet secondaire hémodynamique sera réversible en quelques minutes et potentiellement traitable par augmentation transitoire de la noradrénaline. Les données publiées jusqu'alors (32, 33, 45) semblent indiquer un très bon profil de sécurité avec notamment une stabilité hémodynamique remarquable.
- **Risque collectif** : le risque immédiat lié à l'administration d'esmolol sera suivi en temps réel par l'ensemble du dispositif de réanimation nécessaire à la prise en charge de patients en situation de choc septique. Toute augmentation inattendue de la tolérance sur le plan hémodynamique, cardiaque ou autre fera l'objet d'une rediscussion de la balance bénéfice/risque.
- **Balance bénéfice/risque** : L'effet bénéfique attendu de l'esmolol, dans ce contexte de milieu de réanimation ne semble pas, au vu des données de tolérance actuelle, être remis en cause par le risque associé à son administration. La balance bénéfice/risque est positive sur cette étude.

## 2.7 DESCRIPTION ET JUSTIFICATION DE LA VOIE D'ADMINISTRATION, DE LA POSOLOGIE, DU SCHEMA D'ADMINISTRATION ET DE LA DUREE DE TRAITEMENT.

Dans le cadre de cette étude, Brévilbloc 10 mg/mL, est utilisé dans l'indication thérapeutique suivante, notifiée dans le RCP :

« Brévilbloc est indiqué dans toute autre situation pour laquelle un contrôle à court terme de la fréquence ventriculaire par un produit de courte durée d'action est nécessaire ».

Le schéma d'administration sera adapté spécifiquement à cette étude afin de prendre en compte les paramètres concernant les patients présentant un choc septique. La dose de charge sera supprimée.

La posologie utilisée sera donc la suivante : début à 25 microgrammes/kg/min implémentée par palier de 5 minutes et de 25 microgrammes/kg/min jusqu'à obtenir la dose maximale de 200 microgrammes/kg/min. Cette posologie plus sécuritaire est justifiée par les travaux suivants : pas de dose de charge (46 - Nikolaou NI, Acute Cardiac Care 2001 ; 47 - Koutouzis S Drugs aging 2006 ).

Compte tenu du manque de données dans le choc septique et malgré les données préliminaires rassurantes, nous avons choisi de débiter par prudence à une posologie de 25 microgrammes/kg/min au lieu des classiques 50 microgrammes/kg/min.

La durée du traitement par l'esmolol est de 6 heures au maximum.

La dose maximale d'entretien est 200 microgrammes/kg/min.

Si l'objectif de diminution de la fréquence cardiaque de 20 % n'a pas été atteint avec la dose maximale d'entretien de 200 microgrammes/kg/min, le patient restera traité par cette dose jusqu'à la fin des 6 heures et sera évalué comme tel.

#### **PROCEDURE D'ADAPTATION DE LA POSOLOGIE D'ESMOLOL EN CAS DE MAUVAISE TOLERANCE**

Si une baisse de l'index cardiaque ou de la pression artérielle moyenne de plus de 20% est constatée au cours de la perfusion d'esmolol, sa posologie sera réduite de 50 microgrammes/kg/min toutes les 20 minutes jusqu'à restauration de l'index ou de la pression artérielle initiale. Avant chaque modification de posologie une évaluation hémodynamique sera réalisée.

Si une pré-charge dépendance est identifiée, le patient bénéficiera d'un remplissage vasculaire jusqu'à sa disparition.

Si les altérations hémodynamiques sont en rapport avec l'apparition d'une dysfonction myocardique la posologie d'esmolol sera réduite.

Compte tenu de sa demi vie n'excédant pas une dizaine de minutes, quelque soit les effets indésirables observés ils disparaîtront très rapidement.

### **3.) OBJECTIFS DE LA RECHERCHE**

#### **3.1 HYPOTHESES CLINIQUES**

Au cours du choc septique chez l'homme, la conséquence d'un traitement  $\beta_1$  bloquant sur l'hémodynamique, la réponse cytokinique et inflammatoire est inconnue. Malgré, le caractère contre-intuitif de l'utilisation d'esmolol dans cette indication, il est probable que comme au cours de l'insuffisance cardiaque non septique et au cours du choc septique expérimental, des effets positifs sur l'inflammation et la tolérance hémodynamique soient induits par l'utilisation de ce médicament. De plus, la baisse de la fréquence cardiaque peut améliorer la performance myocardique *via* l'amélioration du remplissage ventriculaire. Ces effets sont très probablement doses dépendantes. Notre objectif est de confirmer la bonne tolérance hémodynamique dans cette situation en étudiant l'évolution de l'index cardiaque et de la posologie de noradrénaline, de démontrer une action anti-inflammatoire en dosant diverses cytokines, et de déterminer la dose optimale permettant d'obtenir cet effet anti-inflammatoire sans conséquences hémodynamiques délétères.

#### **3.2 OBJECTIFS**

##### **3.2.1. Objectif principal**

Décrire et comparer la valeur moyenne de l'index cardiaque avant/après l'administration d'esmolol, titré pour une baisse de 20 % de la fréquence cardiaque chez des patients en état de choc septique.

##### **3.2.2. Objectifs secondaires**

Les objectifs secondaires sont:

- Décrire et comparer la valeur moyenne de la posologie de noradrénaline avant/après administration d'esmolol titré pour une baisse de 20 % de la fréquence cardiaque chez des patients en état de choc septique.
- Décrire l'effet de l'esmolol sur la dysfonction ventriculaire appréciée par échocardiographie.
- Etudier l'effet de l'esmolol sur les paramètres de circulation régionale et microcirculatoires (clairance ICG par Limon, NIRS, OPS sub-lingual).
- Etudier les corrélations entre les données hémodynamiques et les marqueurs biologiques de l'agression (dosages plasmatiques de cytokines pro et anti-inflammatoires).

#### **4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE**

##### **4.1. ENONCE PRECIS DES CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX ET, LE CAS ECHEANT, DES CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES**

###### **4.1.1 Critère de jugement principal**

Le critère de jugement principal est la valeur de l'index cardiaque, exprimé en l/min/m<sup>2</sup>, mesuré à différents temps : H0-H1-H2-H3-H4-H5 et H6

L'index cardiaque (Ic) correspond à la quantité de sang expulsé par chacun des ventricules cardiaques par minute et par mètre carré de surface corporelle.

Il est calculé par la formule suivante :

$Ic = (\text{Fréquence cardiaque} \times \text{Volume d'éjection systolique}) / \text{surface corporelle}$

Ou  $Ic = \text{Débit cardiaque} / \text{surface corporelle}$

Son unité est le l /min/ m<sup>2</sup>

L'index cardiaque sera mesuré en continu par technologie PICCO.

#### **4.1.2 Critères de jugement secondaires**

- Dose de noradrénaline nécessaire pour maintenir la Pression artérielle moyenne
- Présence d'une dysfonction ventriculaire définie à l'aide des paramètres d'échocardiographie présentés dans le paragraphe 4.2.2.1
- Paramètres de circulation régionale et microcirculatoires :
  - Paramètres obtenus par la technologie NIRS
  - clairance ICG par Limon exprimé en mL/min
  - Paramètres obtenus par la technologie OPS Sublingual
- Paramètres biologiques : concentrations en cytokines pro et anti-inflammatoires.

### **4.2 DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE**

#### **4.2.1 PLAN EXPERIMENTAL**

Il s'agit d'une étude pilote médicament de phase II ouverte, monocentrique, interventionnelle. Les effets de ce traitement seront évalués pendant six heures. Un recueil de la survie à 28 jours sera également réalisé.

#### **4.2.2 DEROULEMENT DE LA RECHERCHE**

##### **4.2.2.1 : Prise en charge des patients selon les procédures de routine**

Tous les patients seront traités selon les recommandations actuelles. Indépendamment de cet essai, ceci imposera ; la mise en place d'outils de mesure (cathéter artériel, veineux central et moniteur Picco) et une optimisation rapide de la pré-charge. L'algorithme d'optimisation de la pré-charge utilisé dans le service en pratique courante est inspiré des recommandations actuelles [39] et utilisé dans les deux services de l'étude.

Après disparition de la pré-charge dépendance, les patients présentant une PAM stable et supérieure à 70 mmHg sans modification de la dose de noradrénaline et/ou nécessité de recourir à un remplissage vasculaire pendant une heure, seront considérés comme stabilisés.

Une fois la stabilisation hémodynamique faite, l'inclusion pourra avoir lieu.

La fréquence cardiaque de référence sera mesurée sur cinq minutes au moment de l'inclusion. À partir de cette valeur, l'objectif sera de diminuer la fréquence cardiaque de 20% par rapport à la fréquence cardiaque de référence.

Le profil hémodynamique des patients sera évalué en continu pour deux raisons principales: assurer leur sécurité et normaliser la pré-charge. Trois catégories de paramètres seront utilisées: des paramètres cliniques, échographiques et des paramètres issus d'un monitoring hémodynamique continu (PiCCO, PULSION, Medical Systems) employé chez tous nos patients en état de choc.

#### **- Les paramètres cliniques**

**Pression artérielle moyenne (PAM)** et **la pression veineuse centrale (PVC)** seront mesurées respectivement par un cathéter artériel et un cathéter veineux central. **Les variations de la pression pulsée ( $\Delta PP$ )** seront calculées à partir de la courbe de pression artérielle par la formule  $(PP_{max} - Pp_{min}) / [(P_{max} + Pp_{min})] / 2$ . Ce paramètre sera uniquement utilisé chez les patients sous ventilation mécanique, en l'absence de mouvement respiratoire spontané et d'arythmie cardiaque. **Le test au lever de jambes** sera également réalisé. Sa positivité sera évaluée par les variations de débit cardiaque.

#### **- Les paramètres échographiques**

**Deux échographies (H0, H6,)** seront réalisées pendant les six heures de la période d'évaluation. A l'occasion de ces examens, quatre paramètres, entre autres, seront mesurés et colligés: (1) une mesure de la fraction systolique évaluée par une fraction de raccourcissement et une fraction d'éjection mesurée par deux techniques (Teichholz /Simpson); (2) Une mesure de l'onde E et de l'onde A du flux mitral mesuré

en doppler pulsé permettant de calculer le rapport E/A; (3) une mesure du temps de décélération de l'onde E ; (4) une mesure de l'onde E' en doppler tissulaire au niveau de l'anneau mitral qui permettra de calculer le rapport E/E'. Chaque échographie sera enregistrée afin de pouvoir être revalidée par un expert local qui relira toutes les échographies de l'étude en aveugle du temps étudié (H0 ou H6).

**- Les paramètres issus du monitoring hémodynamique continu par Picco (PULSION, Medical Systems)**

Tous les patients bénéficieront d'un monitoring continu du débit cardiaque (Picco2, PULSION, Medical Systems). Cet outil permet de réaliser une mesure du débit cardiaque par thermodilution transpulmonaire. A partir de la valeur obtenue, les variations du débit cardiaque sont évaluées par l'analyse du contour de l'onde de pouls artériel. Cet outil permet également de mesurer l'index cardiaque en continu. En outre, il permet de surveiller les variations de la saturation veineuse centrale en oxygène à l'aide d'une sonde à fibres optiques. Toutes les données hémodynamiques de cet outil seront sauvegardées par l'intermédiaire d'une clé USB connectée au dos de l'appareil.

De plus les paramètres suivants sont également fait en routine dans nos deux services dans le cadre du monitoring du patient en choc septique et les données seront collectées dans le cadre de l'étude :

- Mesure clairance ICG par Limon,
- Mesure NIRS éminence thénar,
- Mesure OPS sub-lingual par un opérateur entraîné
- Biologie standard
- ECG
- Etat volémique
- Paramètres de ventilation

**4.2.2.2 Procédures spécifiques à l'étude**

Le déroulement spécifique de l'étude se décompose en 2 parties : l'inclusion (J0) et un recueil de la survie à J28.

### **A) Inclusion des patients (J0)**

- L'investigateur va recueillir le consentement soit du patient si cela est possible, soit de la personne de confiance si elle est présente.

- Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion.

Le protocole de recueil se décompose en plusieurs périodes : H0-H1-H2 H3-H4-H5 et H6.

#### 1) H0

- Prise en charge du patient par les procédures de routine et suivi des paramètres décrit en 4.2.2.1

- Examens réalisés spécifiquement pour la recherche :

Prélèvement de 2 tubes supplémentaires, équivalent à un volume de sang de 10 mL, au cours d'une prise de sang entrant dans le cadre du suivi normal du patient. Ces- 2 tubes permettront l'analyse spécifique :

-le dosage de la concentration de cytokines pro et anti-inflammatoires : TNF, IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), MIP-2, E-selectin, P-selectin, ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). (cf annexe 3)

Suite à ces examens et toujours au cours de la période H0-H1, l'esmolol sera introduit selon la procédure décrite dans le paragraphe 2.7.

A l'issue de la titration, la dose d'esmolol correspondante sera entretenue jusqu'à la fin de H6 (360 minutes).

#### 2) H1, H2, H3 H4 H5

Durant ces périodes, la dose d'entretien de l'esmolol sera maintenue.

A la fin de chaque heure, les paramètres cliniques suivants seront recueillis : Fréquence cardiaque, mesures de pression artérielle (PAS, PAD et PAM), Index cardiaque et diurèse pendant l'heure écoulée.

Des informations concernant les traitements utilisés au cours de l'heure écoulée seront également collectées : dose cumulée d'esmolol, dose cumulée de noradrénaline, dose



cumulée de dobutamine,, dose cumulée d'hypnovel, dose cumulée de sufentanyl et volume et nature du remplissage vasculaire.

### 3) H6

A H6 le bilan et le relevé des paramètres seront identiques a celui de H0 : prélèvements sanguins. (2 tubes supplémentaires, pour un total de 10 mL de sang seront à nouveau prélevés).

Les paramètres cliniques et les informations concernant les traitements utilisés seront collectés à la fin de H6. Les données seront identiques à celles collectées à H1 H2 H3 H4 H5.

Au terme de ce bilan, l'esmolol sera arrêté et dès la fréquence cardiaque revenue à la valeur basale H0, la noradrénaline sera titrée pour maintenir la PAM a la valeur basale. Un nouveau bilan PiCCO sera réalisé pour confirmer le retour a l'état basal à H7.

En cas d'arrêt prématuré du traitement, avant arrêt un jeu de meure identique à H0 (sauf biologie sera réalisée. Le protocole de mesure est poursuivi à son terme dans tous les cas même en l'absence de l'esmolol..

### **B) Recueil de la survie à J28**

Le recueil de la survie, Issue (patient décédé – vivant) sera fait à J28. Cela sera réalisé par un appel téléphonique si la donnée de figure pas dans le dossier médical du patient.

L'ensemble des examens spécifiques à l'étude réalisés aux différents temps est résumé dans le tableau ci-dessous.

FLOWCHART

	Inclusion (J0- H0)	Inclusion (J0 :H1, H2, H3,H4, H5)	Inclusion (J0 :H6)	Visite J28
<i>Mode de réalisation de la visite</i>	<i>Hospitalisation</i>	<i>Hospitalisation</i>	<i>Hospitalisation</i>	<i>Hospitalisation ou par téléphone</i>
Recueil du consentement écrit	✓			
Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion	✓			
Bilan biologique (cytokines pro et anti-inflammatoires)	✓		✓	
Administration d'Esmolol selon la séquence de titration (mesure de la dose cumulée)	✓	✓	✓	
Recueil du statut vital		✓	✓	✓
Recueil des Evénements Indésirables Graves	✓	✓	✓	✓

Les données qui seront recueillies dans le CRF à chaque période sont décrites en annexe n° 11.

#### 4.3 DESCRIPTION DES MESURES PRISES POUR REDUIRE ET EVITER LES BIAIS

##### **4.3.1. STRATEGIE DE SEDATION**

La stratégie de sédation sera celle utilisée en routine par les deux services concernés, c'est-à-dire la sédation minimale. La sédation ne sera pas modifiée durant l'expérimentation.

##### **4.3.2. EVALUATION PREALABLE DE LA PRECHARGE DEPENDANCE**

La comparaison des profils hémodynamiques est l'un des enjeux de cette étude. Au cours du choc septique, le niveau de pré-charge est variable et influence considérablement les paramètres hémodynamiques. Il sera donc évalué et optimisé avant l'inclusion et la négativité des manœuvres de pré-charge dépendance l'attestera. Seuls les patients stabilisés au niveau hémodynamique seront inclus. L'objectif est de garder le patient stable pendant les 6 heures d'expérimentation. Ceci permettra d'identifier les conséquences myocardiques du traitement  $\beta$ -bloquant dans des conditions de pré-charge normalisée.

##### **4.3.3. STRATEGIE DE REGLAGE DE VENTILATEUR**

Les réglages du ventilateur notamment le niveau de pression expiratoire positif peuvent avoir des effets sur l'hémodynamique des patients. Idéalement les paramètres ventilatoires ne seront pas changés durant les 6 heures d'expérimentation. Si des modifications de ces réglages sont nécessaires, ils seront colligés dans le cahier d'observation.

#### **4. 4.MEDICAMENT EXPERIMENTAL : ESMOLOL (BREVIBLOC®)**

##### **4.4.1 COMPOSITION**

Chlorhydrate d'esmolol ..... 10 mg

Pour 1 ml de solution pour perfusion. pH = 4,5 à 5,5

*Excipients* : Chlorure de sodium, acétate de sodium trihydraté, acide acétique glacial, hydroxyde de sodium ou acide chlorhydrique, eau pour préparations injectables.

#### **4.4.2 Description de la posologie et des modalités d'administration**

Le schéma d'administration sera adapté spécifiquement à cette étude afin de prendre en compte les paramètres concernant les patients présentant un choc septique. La dose de charge sera supprimée.

La posologie utilisée sera donc la suivante : début à 12.5 microgrammes/kg/min implémentée par palier de 5 minutes et de 25 microgrammes/kg/min jusqu'à obtenir la dose maximale de 200 microgrammes/kg/min. Cette posologie plus sécuritaire est justifiée par les travaux suivants : pas de dose de charge (46 - Nikolaou NI, Acute Cardiac Care 2001 ; 47 - Koutouzis S Drugs aging 2006 ).

Compte tenu du manque de données dans le choc septique et malgré les données préliminaires rassurantes, nous avons de choisi de débiter par prudence à une posologie de 25 microgrammes/kg/min au lieu des classiques 50 microgrammes/kg/min.

La durée du traitement par l'esmolol est de 6 heures au maximum.

#### **4.4.3 APPROVISIONNEMENT EN BREVIBLOC®**

La Pharmacie de Brabois Adultes (B. DEMORE) commandera les poches de Brevibloc® selon le circuit normal d'approvisionnement de la pharmacie (selon les modalités définies avec le laboratoire Baxter).

Elles seront étiquetées par la pharmacie avec une contre-étiquette portant les mentions suivantes : « Recherche biomédicale- Etude ESMOSEPSIS- Promoteur : CHU de NANCY».

Une dotation sera mise en place dans les deux services participant à l'étude. Une feuille de traçabilité sera remplie pour chaque poche utilisée et ce document permettra de demander le renouvellement de la dotation à la pharmacie (si besoin).

#### **4.5. DUREE PREVUE DE PARTICIPATION DES PERSONNES ET DESCRIPTION DE LA CHRONOLOGIE ET DE LA DUREE DE TOUTES LES PERIODES DE L'ESSAI**

Pour chaque patient la durée de participation est fixée à 28 jours.

La durée prévue d'inclusion est de 18 mois.

La durée prévisionnelle de la recherche sera de 24 mois.

La fin de l'étude correspondra au dernier suivi du dernier patient inclus.

#### **4.6. DESCRIPTION DES REGLES D'ARRET DEFINITIF OU TEMPORAIRE**

##### **4.6.1. ARRET DE LA PARTICIPATION D'UNE PERSONNE A LA RECHERCHE**

- Décision du patient : les patients sont en droit de quitter l'étude librement dès qu'ils le souhaitent. Le formulaire de sortie d'étude doit être complété, détaillant les motivations du patient.
- Décision du membre de la famille ou de la personne de confiance : le membre de la famille ou la personne de confiance sera libre dès qu'elle le souhaite de demander à ce que le patient quitte la recherche. Dans ce cas, si le patient n'est pas en état de donner son consentement par lui-même, alors le patient ne pourra pas faire partie de l'étude.
- Décision de l'investigateur : en cas d'apparition d'une contre-indication au  $\beta$  bloquants, la participation du patient à l'étude sera interrompue.
- Si le patient présente une intolérance au traitement qui est définie comme suit : baisse de plus de 20 % de la pression artérielle ou de l'index cardiaque par rapport à la valeur de Ho, dans ce cas l'esmolol sera diminué et maintenu à la dose maximale tolérée.
- Modalité de prise en charge du patient en cas d'arrêt de la titration en cours : Le traitement sera poursuivi à la dose maximale tolérée et évalué

comme tel (en effet les effets anti-inflammatoires pourraient être dissociés des effets hémodynamiques).

#### **4.6.2 ARRET D'UNE PARTIE OU DE LA TOTALITE DE LA RECHERCHE**

La décision d'arrêter l'étude sera prise par le Promoteur selon les recommandations émises par le comité de pilotage ou le comité de surveillance indépendant.

#### **4.7 COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES**

L'objectif de la collection est de permettre un dosage en série de la concentration des cytokines pro et anti-inflammatoires.

Compte tenu du coût des kits de dosage, une mesure au fil des inclusions n'est pas raisonnable. L'ensemble des prélèvements sera donc traité en fin d'étude.

L'étiquetage se fera par étiquettes spécifiques au sein du service.

Les prélèvements (4 tubes par patient en tout) seront donc congelés à -20°C dans le service de Réanimation Médicale Brabois, CHU Nancy brabois, 54511 Vandoeuvre les Nancy, sous la responsabilité du Pr Levy .

Les tubes seront ensuite transférés au CIC-Plurithématique, Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux Louis Mathieu, 4, rue du Morvan, 54 500 VANDOEUVRE-LES-NANCY et conservés dans un congélateur à -80°C sous la responsabilité du Pr Zannad avant analyse.

La collection sera détruite à la fin de l'étude.

### **5. CRITERES DE SELECTION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE**

#### **5.1. CRITERES D'INCLUSION**

Pourront être inclus tous les patients présentant les critères suivants :

- Hommes ou femmes d'âges  $\geq 18$  ans,
- Présentant un choc septique,
- Patient mis en condition (cathéter artériel, cathéter veineux central avec PVC et Picco) indépendamment du protocole,
- Remplissage optimisé (delta PP, épreuve de lever de jambe passif négatifs)
- Score SOFA  $\geq 3$  calculé à l'inclusion (Annexe 6),
- Index cardiaque  $> 3$  l/min/m<sup>2</sup> et fréquence cardiaque  $> 100$  b/min
- Patient ayant donné un consentement libre, éclairé et par écrit. A défaut, le consentement sera obtenu auprès d'un membre de la famille, s'il est présent. Dès que possible, le patient sera informé et son consentement lui sera demandé pour la poursuite éventuelle de la recherche.
- Etre inscrit au régime de Sécurité Sociale

## 5.2. CRITERES DE NON-INCLUSION

Ne pourront être inclus les patients présentant l'un des critères suivants :

- Antécédents d'asthme sévère
- Antécédents de bronchopneumopathie chronique obstructive sévère,
- Antécédents de bloc auriculo-ventriculaire de 2e ou du 3e degré non appareillé
- Maladie du sinus auriculaire non appareillée
- Troubles graves de la conduction auriculo ventriculaire sans stimulateur cardiaque
- Insuffisance cardiaque chronique « sévère » définie par une fraction d'éjection préalable  $< 40\%$ ,
- Choc cardiogénique
- Bradycardie inférieure à 50 battements par minute
- Hypotension persistante sous noradrénaline
- Hypersensibilité aux bêtabloquants, ou à l'un des excipients
- Angor de Prinzmetal,
- Phéochromocytome non traité,
- Traitement en cours par antagonistes du calcium (bépridil, diltiazem et vérapamil)

- Altération de la fonction ventriculaire gauche (FE <40%) à l'exclusion de la cardiomyopathie septique
- Acidose métabolique avec pH<7.2
- Hypertension pulmonaire
- Grossesse évolutive
- Patient mineur
- Limitation thérapeutique

## 6. EVALUATION DE LA SECURITE

### 6.1 DESCRIPTION DES PARAMETRES D'EVALUATION DE LA SECURITE

#### Définitions

- **Evènement indésirable**

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche.

- **Effet indésirable d'un médicament expérimental**

Toute réaction nocive et non désirée à un médicament expérimental quelle que soit la dose administrée

- **Evènement ou effet indésirable grave**

Tout évènement ou effet indésirable qui entraîne la mort, met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche, nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation, provoque une incapacité ou un handicap importants ou durables, ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale, et s'agissant du médicament, quelle que soit la dose administrée.

*Extension:* tout effet ou évènement indésirable jugé comme grave par le professionnel de santé, en particulier les événements nécessitant une intervention pour éviter l'une des conséquences notées ci-dessus, et certains résultats d'examens paracliniques. La liste des évènements médicalement importants sera également



utilisée pour la qualification de la gravité :

(<http://eudravigilance.ema.europa.eu/human/textforIME.asp> ).

- **Effet indésirable inattendu d'un médicament expérimental**

Tout effet indésirable dont la nature, la sévérité ou l'évolution ne concorde pas avec les informations figurant dans le résumé des caractéristiques du produit.

- **Fait nouveau**

Toute nouvelle donnée de sécurité, pouvant conduire à une réévaluation du rapport des bénéfices et des risques de la recherche ou du médicament expérimental, ou qui pourrait être suffisant pour envisager des modifications dans l'administration du médicament expérimental, dans la conduite de la recherche.

## **Document de référence : RCP de Brevibloc® (autorisé par l'ANSM le 27/09/2012)**

### **Liste des effets indésirables attendus**

Troubles du métabolisme et de la nutrition

- Anorexie
- Hyperkaliémie
- Acidose métabolique

Affections psychiatriques

- Dépression
- Pensées anormales
- Anxiété
- Irritabilité

Affections du système nerveux

- Somnolence
- Syncope
- Céphalées
- Convulsions
- Paresthésies
- Troubles de la parole
- Troubles de l'attention
- Etat de confusion
- Agitation

Affections oculaires

- Troubles de la vision

Affections cardiaques

- Vertiges
- Douleurs thoraciques
- Arrêt sinusal
- Rythme idioventriculaire accéléré
- Bradycardie
- Asystole
- Artériospasme coronaire
- Bloc auriculo-ventriculaire
- Arrêt cardiaque.
- Hausse de la pression artérielle pulmonaire

- Défaillance cardiaque
- Extrasystoles ventriculaires
- Rythme nodal
- Angine de poitrine
- Affections vasculaires
- Hypotension
- Ischémie périphérique
- Thrombophlébite
- Pâleur
- Bouffée congestive
- Affections respiratoires, thoraciques et médiastinales
  - Dyspnée
  - Oedème pulmonaire
  - Bronchospasme
  - Respiration sifflante
  - Congestion nasale
  - Rhonchus
  - Râles
- Affections gastro-intestinales
  - Nausées
  - Dysgueusie
  - Vomissements
  - Dyspepsie
  - Constipation
  - Bouche sèche
  - Douleur abdominale
- Affections de la peau et du tissu sous-cutané
  - Diaphorèse
  - Décoloration de la peau
  - Nécrose cutanée (due à l'extravasation)
  - Psoriasis
  - Erythème
  - Angiooedème
  - Urticaire
- Affections musculo-squelettiques et systémiques
  - Douleur musculo-squelettique 4
  - Faiblesse musculaire
  - Affections du rein et des voies urinaires
  - Rétention urinaire
- Troubles généraux et anomalies au site d'administration
  - Asthénie
  - Frissons
  - Phlébite au niveau du site de perfusion
  - Fatigue
  - Fièvre
  - Vésicules au site de perfusion
  - Réaction au site d'injection
  - OEdème
  - Vésication
  - Réaction au site de perfusion
  - Douleur
  - Inflammation au site de perfusion
  - Brûlure au site de perfusion
  - Induration au site de perfusion
  - Ecchymose au site de perfusion

## **6.2 METHODES ET CALENDRIER PREVUS POUR MESURER, RECUEILLIR ET ANALYSER LES PARAMETRES D'EVALUATION DE LA SECURITE**

Les évènements indésirables seront recueillis durant toute l'administration de l'esmolol (H0-H6) et au cours des 2 heures suivant cette administration, c'est-à-dire H0 + 8 heures.

Par ailleurs, conformément au RCP, Bréviploc® sera utilisé avec prudence chez les diabétiques et en cas d'hypoglycémie avérée ou soupçonnée. Les bêta-bloquants peuvent masquer les symptômes annonciateurs d'une hypoglycémie tels qu'une tachycardie. Cependant les vertiges et les sueurs ne sont pas significativement perturbés. L'administration concomitante de bêta-bloquants et d'antidiabétiques peut accroître les effets de ces derniers (baisse de la glycémie)

- **Comité de pilotage**

Le Comité de Pilotage est constitué pour traiter les problèmes d'ordre scientifique, méthodologique et éthique posés par l'essai. Il détermine initialement la méthodologie de l'essai, assure l'information de l'ensemble des participants et veille à l'application des règles de publication des résultats. Il est constitué des initiateurs cliniciens du projet et du biostatisticien en charge du projet.

Il se réunit tous les 3 à 6 mois selon les besoins. Il décide toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de l'essai, décide en cours de recherche des conduites à tenir dans les cas imprévus, surveille le déroulement de la recherche en particulier sur le plan de la tolérance et des évènements indésirables.

Seul le promoteur est habilité à prendre la décision d'arrêter une recherche biomédicale.

- **Comité Indépendant de surveillance**

Un comité indépendant de surveillance sera constitué sur proposition du comité de pilotage et validation par le promoteur. Il sera constitué de 2 réanimateurs et d'un pharmacovigilant.

### 6.3. PROCEDURES MISES EN PLACE EN VUE DE L'ENREGISTREMENT ET DE LA NOTIFICATION DES EVENEMENTS INDESIRABLES

Au cours de cette étude, tous les évènements indésirables doivent être reportés sur le formulaire de déclaration des effets indésirables du CRF, en détaillant la sévérité, la prise en charge et l'éventuel rapport avec l'administration d'esmolol. On distinguera les évènements indésirables selon leur gravité, selon les procédures décrites ci-dessous.

- **Evénements indésirables (EI) non graves**

Tout événement indésirable - non grave suivant la définition précédente - observé lors de la recherche et dans ses suites devra être reporté dans le cahier d'observation dans la section prévue à cet effet.

Un seul événement doit être reporté par item. L'événement peut correspondre à un symptôme, un diagnostic ou à un résultat d'examen complémentaire jugé significatif. Tous les éléments cliniques ou paracliniques permettant de décrire au mieux l'événement correspondant doivent être reportés.

Tout patient présentant un événement indésirable doit être suivi jusqu'à la résolution ou la stabilisation de celui-ci, et l'évolution en sera notée sur la page correspondante.

### 6.4. PROCEDURE DE DECLARATION DES EIG

- **Promoteur**

Les investigateurs doivent notifier **immédiatement** au promoteur les évènements indésirables graves (*voir formulaire de déclaration d'un EIG en annexe 7*) tels que définis ci-dessus.

Dès qu'un investigateur prend connaissance d'un EIG ou d'un fait nouveau, il le déclare sans délai au promoteur en faxant la fiche de déclaration d'EIG au **03 83 32 33 44**.

Pour chaque évènement indésirable grave, **l'investigateur devra émettre un avis sur le lien de causalité de l'évènement avec chaque médicament expérimental et les autres traitements éventuels.**

L'obtention d'informations relatives à la description et l'évaluation d'un évènement indésirable peuvent ne pas être possibles dans le temps imparti pour la déclaration initiale.

**Aussi, l'évolution clinique ainsi que les résultats des éventuels bilans cliniques et des examens diagnostiques et/ou de laboratoire, ou toute autre information permettant une analyse adéquate du lien de causalité seront rapportés :**

- **soit sur la déclaration initiale d'EIG s'ils sont immédiatement disponibles,**
- **soit ultérieurement et le plus rapidement possible, en envoyant par fax une nouvelle déclaration d'EIG complétée (et en précisant qu'il s'agit d'un suivi d'EIG déclaré et le numéro de suivi).**

Toutes les déclarations faites par les investigateurs devront identifier chaque sujet participant à la recherche **par un numéro de code unique** attribué à chacun d'entre eux.

**En cas de décès notifié** d'un sujet participant à la recherche, **l'investigateur communiquera au promoteur tous les renseignements complémentaires demandés** (compte-rendu d'hospitalisation, résultats d'autopsie...).

Tout fait nouveau survenu dans la recherche ou dans le contexte de la recherche, provenant de données de la littérature ou de recherches en cours, devra être notifié au promoteur.

- **Déclaration des EI graves aux autorités de santé**

Elle sera assurée par le responsable de vigilance des essais cliniques du promoteur, après évaluation de la gravité de l'évènement indésirable, du lien de causalité avec chaque médicament expérimental et les autres traitements éventuels ainsi que du caractère inattendu des effets indésirables.

Toutes les suspicions d'effet indésirable grave inattendu seront déclarées par le promoteur aux autorités compétentes dans les délais légaux.

- S'il s'agit d'un effet indésirable grave inattendu (EIGI) ou si c'est un fait nouveau, le promoteur entre en contact avec l'investigateur pour rédiger un rapport initial qui sera transmis à l'ANSM, au CPP, à l'investigateur coordonnateur et à EUDRAVIGILANCE dans les 7 jours en cas de décès ou de mise en jeu du pronostic vital, sinon dans les 15 jours.

Lorsque l'évènement n'est pas résolu à la date d'envoi du fax, l'investigateur est tenu d'envoyer un rapport complémentaire afin de documenter l'évolution ou de réactualiser les données manquantes.

- S'il s'agit d'un effet indésirable grave attendu, il sera colligé par le promoteur en vue de la rédaction des rapports annuels de sécurité.

**Toute donnée de sécurité ou tout fait nouveau qui pourrait modifier significativement l'évaluation du rapport des bénéfices et des risques d'un médicament expérimental, ou de la recherche, ou qui pourrait conduire à envisager des modifications concernant l'administration du médicament ou la conduite de la recherche, sera transmise par le promoteur aux autorités compétentes, au Comité de Protection des Personnes et aux investigateurs de la recherche.**

Par exemple :

a) toute augmentation cliniquement significative de la fréquence d'apparition d'un effet indésirable grave attendu ;

b) des suspicions d'effet indésirable grave inattendu survenus chez des participants ayant terminé l'essai et qui sont notifiés par l'investigateur au promoteur, ainsi que des rapports de suivi éventuels ;

c) tout fait nouveau concernant le déroulement de l'essai clinique ou le développement du médicament, lorsque ce fait nouveau est susceptible de porter atteinte à la sécurité des participants. A titre d'exemple :

- un événement indésirable grave susceptible d'être lié aux investigations et aux procédures de diagnostic de l'essai et qui pourrait modifier le déroulement de cet essai,

- un risque significatif pour la population de l'essai comme par exemple un manque d'efficacité du médicament utilisé dans le traitement d'une maladie mettant en jeu le pronostic vital,
  - des résultats significatifs de sécurité issus d'une étude menée chez l'animal récemment terminée (telle qu'une étude de carcinogénicité),
  - un arrêt anticipé ou une interruption temporaire pour des raisons de sécurité d'un essai conduit avec le même médicament dans un autre pays,
  - un effet indésirable grave inattendu lié à un médicament non expérimental nécessaire à la réalisation de l'essai (ex : « challenge agents », traitement de secours)
- d) les recommandations du comité de surveillance indépendant, le cas échéant, si elles sont pertinentes pour la sécurité des personnes,
- e) tout effet indésirable grave inattendu transmis au promoteur par un autre promoteur d'un essai clinique mené dans un pays tiers portant sur le même médicament.

#### **6.5. MODALITES ET DUREE DU SUIVI DES PERSONNES SUITE A LA SURVENUE D'EVENEMENTS INDESIRABLES**

Tout patient présentant un évènement indésirable doit être suivi jusqu'à la résolution ou la stabilisation de celui-ci.

Si l'évènement est grave, un suivi d'EIG sera envoyé au **03 83 32 33 44**.

#### **6.6 RAPPORTS DE SECURITE**

- **Rapports annuels de sécurité :** le promoteur rédige les rapports annuels de sécurité et les transmet à l'ANSM, au CPP et à l'investigateur coordonnateur. L'investigateur coordonnateur transmettra au promoteur toutes les données nécessaires à la rédaction de ce rapport.
- **Rapport final :** il est rédigé par le promoteur et l'investigateur coordonnateur dans un délai d'un an après la fin de l'étude. Tous les investigateurs sont informés des résultats de l'étude. Un résumé est adressé à l'ANSM par le promoteur.

## 7. STATISTIQUES

Le plan statistique et l'analyse seront effectués par le Dr R. Fays, CIC Nancy.

Le recrutement de 25 patients permettra de conclure avec une puissance de 80% à un effet significatif au seuil bilatéral de 5% pour une variation  $\geq 0,6$  déviation standard de l'index cardiaque entre H0 et H6. D'après une série de 31 patients en choc septique de profil identique hospitalisés dans notre service, une telle différence correspondrait à une variation de 0.6 l/min de l'index cardiaque, de 2,5% de la FE et de 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  de la posologie de noradrénaline.

L'évolution des paramètres entre H0 et H6 sera analysée à l'aide du test de Student pour séries appariées si l'hypothèse de normalité des distributions peut être acceptée, par le test des différences couplées de Wilcoxon dans le cas contraire. L'analyse de la tolérance sera effectuée en intention de traiter.

Les événements indésirables seront décrits par leur fréquence et présentés en fonction du bras de traitement, du type d'événement, de la relation de causalité (certaine, probable, possible, non lié) et de leur intensité.

Les tests seront effectués avec un risque de première espèce  $\alpha$  de 5 % en formulation bilatérale.

Les analyses statistiques seront réalisées à l'aide des logiciels R ou SAS.

- **Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non validés**

La prise en compte des données manquantes sur le critère principal sera réalisée en fonction de la complexité des situations. Deux méthodes seront utiliser la méthode dite LOCF (remplacement par la dernière valeur disponible) et les imputations multiples pour réaliser des analyses de sensibilités.

- **Analyse intermédiaire**

Il n'y a pas d'analyse intermédiaire programmée.



- **Gestion des modifications apportées au plan d'analyse**

Les éventuels changements de méthodes statistiques décidés rétrospectivement et validés par le comité de pilotage seront présentés et justifiés dans un amendement au protocole et dans le rapport de l'essai.

- **Choix des personnes à inclure dans l'analyse**

Les patients remplissant les critères d'éligibilité et pour lesquels un consentement aura été recueilli seront inclus dans l'analyse. Les perdus de vue ou sortis d'études, déviations au protocole seront décrits et comparés au groupe analysé.

## **8. DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE**

Toutes les données et informations concernant le patient resteront strictement confidentielles. Les personnes ayant un accès direct conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur, notamment les articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique (par exemple, les investigateurs, les personnes chargées du contrôle de qualité, les moniteurs, les assistants de recherche clinique, les auditeurs et toutes personnes appelées à collaborer aux essais) prennent toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Les données collectées par ces personnes au cours des contrôles de qualité ou des audits sont alors rendues anonymes.

## **9. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE**

Les ARC représentants du promoteur effectueront des visites des centres investigateurs au rythme correspondant au schéma de suivi des patients dans le protocole, aux inclusions dans les différents centres et au niveau de risque qui a été attribué à la recherche.

- Visite préparatoire et d'ouverture du centre : avant inclusion, pour une mise en place du protocole et prise de connaissance avec les différents intervenants de la recherche biomédicale.

- Lors des visites suivantes, les cahiers d'observation seront revus au fur et à mesure de l'état d'avancement de la recherche par les ARC. L'investigateur principal ainsi que les autres investigateurs qui incluent ou assurent le suivi des personnes participant à la recherche s'engagent à recevoir les ARC à intervalles réguliers.

Lors de ces visites sur site et en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques, les éléments suivants seront revus :

- Respect du protocole et des procédures définies pour la recherche,
- Vérification des consentements éclairés des patients,
- Examen des documents source et confrontation avec les données reportées dans le cahier d'observation quant à l'exactitude, les données manquantes, la cohérence des données selon les règles édictées par les procédures de la DRI

- Visite de fermeture : récupération des cahiers d'observation, bilan à la pharmacie, documents de la recherche biomédicale, archivage.

A ce titre, l'investigateur s'engage à mettre à la disposition de l'ARC lors de ses visites de monitoring :

- Les dossiers médicaux des patients
- Les cahiers de recueil de données
- Les formulaires de consentement des patients inclus

Transcription des données dans le cahier d'observation

Toutes les informations requises par le protocole doivent être fournies dans le cahier d'observation et une explication donnée par l'investigateur pour chaque donnée manquante.

Les données devront être transférées dans les cahiers d'observation au fur et à mesure qu'elles sont obtenues qu'il s'agisse de données cliniques ou para-cliniques. Les données devront être copiées de façon nette et lisible à l'encre noire dans ces cahiers (ceci afin de faciliter la duplication et la saisie informatique).

Les données erronées dépistées sur les cahiers d'observation seront clairement barrées et les nouvelles données seront copiées sur le cahier avec les initiales et la date par le membre de l'équipe de l'investigateur qui aura fait la correction.

L'anonymat des sujets sera assuré par un numéro de code et les initiales de la personne qui se prête à la recherche sur tous les documents nécessaires à la recherche, ou par effacement par les moyens appropriés des données nominatives sur les copies des documents source, destinés à la documentation de la recherche.

Les données informatisées sur un fichier seront déclarées à la CNIL selon la procédure adaptée au cas.

## **10. CONSIDERATIONS LEGALES ET ETHIQUES**

Le promoteur et les investigateurs s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la loi n°2004-806 du 9 août 2004, ainsi qu'en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques (I.C.H. version 4 du 1<sup>er</sup> mai 1996 et décision du 24 novembre 2006) et la déclaration d'Helsinki (Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains, Séoul 2008).

La recherche est conduite conformément au présent protocole. Les investigateurs s'engagent à respecter le protocole en tous points en particulier en ce qui concerne le recueil du consentement et la notification et le suivi des événements indésirables graves.

### ***10.1 Demande d'autorisation auprès de l'ANSM***

Pour pouvoir démarrer la recherche, le CHU de Nancy en tant que promoteur doit soumettre un dossier de demande d'autorisation auprès de l'autorité compétente l'ANSM. L'autorité compétente, définie à l'article L. 1123-12, se prononce au regard de la

sécurité des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale, en considérant notamment la sécurité et la qualité des produits utilisés au cours de la recherche conformément, le cas échéant, aux référentiels en vigueur, leur condition d'utilisation et la sécurité des personnes au regard des actes pratiqués et des méthodes utilisées ainsi que les modalités prévues pour le suivi des personnes.

### ***10.2 Demande d'avis au Comité de Protection des Personnes***

En accord avec l'article L.1123-6 du Code de Santé Publique, le protocole de recherche doit être soumis par le promoteur à un Comité de Protection des Personnes. L'avis de ce comité est notifié à l'autorité compétente par le promoteur avant le démarrage de la recherche.

### ***10.3 Modifications***

La DRI doit être informée de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur.

Les modifications devront être qualifiées en substantielles ou non.

Une modification substantielle est une modification susceptible, d'une manière ou d'une autre, de modifier les garanties apportées aux personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale (modification d'un critère d'inclusion, prolongation d'une durée d'inclusion, participation de nouveaux centres,...).

Après le commencement de la recherche, toute modification substantielle de celle-ci à l'initiative du promoteur doit obtenir, préalablement à sa mise en oeuvre, un avis favorable du comité et une autorisation de l'autorité compétente. Dans ce cas, si cela est nécessaire, le comité s'assure qu'un nouveau consentement des personnes participant à la recherche est bien recueilli.

Toute modification substantielle devra faire l'objet **par le promoteur** d'une demande d'autorisation auprès de l'ANSM et/ou d'une demande d'avis du CPP.

#### ***10.4 Déclaration CNIL***

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de référence » (MR-001) en application des dispositions de l'article 54 alinéa 5 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Ce changement a été homologué par décision du 5 janvier 2006. Le CHU de NANCY a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de référence ».

Seules les données nécessaires à la recherche seront recueillies. Le patient a néanmoins le droit de s'opposer à ce que les données le concernant fassent l'objet d'un traitement automatisé. Le patient aura à tout moment le droit d'accéder aux données le concernant. Il aura également le droit de demander à ce que les données inexactes ou devenues inexactes soient rectifiées. Il pourra à tout moment exercer ses droits auprès du Pr LEVY investigateur coordonnateur.

Pour toutes les informations de nature médicale, ses droits pourront être exercés directement ou par l'intermédiaire du médecin de son choix.

Dans le cas où le consentement a été donné par un membre de la famille (ou par la personne de confiance), seul le patient est en mesure d'accéder aux données le concernant tel que décrit précédemment.

#### ***10.5 Note d'information et Consentement éclairé***

Avant de recueillir le consentement du patient, l'investigateur s'engage lui à délivrer une information claire et la plus complète possible sur l'étude envisagée ; il lui remet également la notice d'information.

Dans le cadre particulier de ce protocole, les personnes sur lesquelles la recherche doit être mise en œuvre ne pourront peut-être pas recevoir l'information sur le protocole et donner leur consentement avant la mise en œuvre du protocole en raison de leur état.

Dans ce cas, si un membre de la famille du patient (ou la personne de confiance définie par l'article L.1111-6 – annexe 5) est présent, celui ci sera informé et son consentement sera sollicité.

Le consentement du patient sera obtenu dès que son état le permet, pour la poursuite de l'étude.

En l'absence de membre de la famille ou de la personne de confiance, l'investigateur inclura le patient dans l'étude et recueillera le consentement de la personne de confiance le plus rapidement possible.

Le patient, le membre de sa famille ou sa personne de confiance, est libre de refuser la participation à l'étude, et il peut retirer à tout moment son consentement et ce, qu'elle qu'en soit la raison, et sans encourir aucune responsabilité.

Le formulaire de consentement sera signé en deux exemplaires par le sujet et le médecin investigateur ainsi qu'un membre de la famille/personne de confiance le cas échéant :

- Un exemplaire sera remis à la personne participant à la recherche
- Un exemplaire sera conservé et archivé par l'investigateur

### ***10.6 Rapport final de la recherche***

Le rapport final de la recherche sera écrit par l'investigateur principal en collaboration avec les autres investigateurs et le statisticien. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu'un consensus aura été obtenu, la version finale devra être avalisée par la signature de chacun des investigateurs et adressée au promoteur dans les meilleurs délais après la fin effective de la recherche. Un rapport rédigé selon le plan de référence de l'autorité compétente doit être transmis à l'autorité compétente ainsi qu'au CPP dans un délai de un an, après la fin de la recherche, s'entendant comme la dernière visite de suivi du dernier sujet inclus. Ce délai est rapporté à 90 jours en cas d'arrêt prématuré de la recherche.

## **11. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE**

Les documents d'une recherche entrant dans le cadre de la loi sur les recherches biomédicales doivent être archivés par toutes les parties pendant une durée de 15 ans après la fin de la recherche (*voir BPC, chapitre 8 : documents essentiels*).

Cet archivage indexé comporte :

- Les copies de courrier d'autorisation de l'ANSM et de l'avis obligatoire du CPP
- Les versions successives du protocole (identifiées par le n° de version et la date de version)
- Les courriers de correspondance avec le promoteur
- Les consentements signés des sujets sous pli cacheté (dans le cas de sujets mineurs signés par les titulaires de l'autorité parentale) avec la liste ou registre d'inclusion en correspondance
- Le cahier d'observation complété et validé de chaque sujet inclus
- Toutes les annexes spécifiques à l'étude
- Le rapport final de l'étude provenant de l'analyse statistique et du contrôle qualité de l'étude (double transmis au promoteur)
- Les certificats d'audit éventuels réalisés au cours de la recherche

La base de données anonymisée ayant donné lieu à l'analyse statistique doit faire l'objet d'archivage par le responsable de l'analyse (support papier ou informatique).

## **12. ASSURANCE ET ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE**

### **12.1. ASSURANCE**

Le promoteur a souscrit auprès de BIOMEDICINSURE pour toute la durée de l'étude une assurance garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant impliqué dans la réalisation de l'étude, indépendamment de la nature des liens existant entre les intervenants et le promoteur.

## 12.2. ENGAGEMENT SCIENTIFIQUE

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations de la loi et à mener la recherche selon les B.P.C., en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki en vigueur. Pour ce faire, un exemplaire du contrat d'étude (**document type DRI**) daté et signé **par chaque investigateur** de chaque service clinique d'un centre participant sera remis au représentant du promoteur.

## 13. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

Le CHU de Nancy est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Le CHU de NANCY doit être mentionné comme étant le promoteur de la recherche biomédicale et comme soutien financier le cas échéant.

Modèle d'écriture de l'adresse du CHU de Nancy dans les publications :

CHU Nancy, département /service, ville, F-code postal, pays.

## 14. BIBLIOGRAPHIE

1. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B; CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168: 165-7
- 2- Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. J Clin Invest. 1985 Oct;76(4):1539-53.
- 3- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. 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 Mar 1;183(3):949-58.



- 4- Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 1992 Jul 17;257(5068):387-9.
- 5- Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, Zetoune FS, Su GL, Arbabi S, Sarma JV, Wang SC, Hemmila MR, Ward PA An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):53-61. Epub 2005 Dec 27.
- 6- Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res*. 1991 Jan;25(1):80-8.
- 7- Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: Role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:155-167
- 8- Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5):2314-9.
- 9- Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12):2348-58.
- 10- Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Jan 10;316(1):70-6
- 11- Lancel S, Joulin O, Favory R, Goossens JF, Kluza J, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P, Neviere R. Ventricular myocyte caspases are directly responsible for

- endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*. 2005 May 24;111(20):2596-604.
- 12- Nevière R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan;163(1):218-25.
- 13- Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock*. 1995 Oct;4(4):269-73.
- 14- Tang C, Liu MS. Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Am J Physiol*. 1996 Jan;270(1 Pt 2):R254-63.
- 15- Shepherd RE, Lang CH, McDonough KH. Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin. *Am J Physiol*. 1987 Feb;252(2 Pt 2):H410-6.
- 16- Zheng M, Han QD, Xiao RP. 2004 Feb 25;56(1):1-15. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Sheng Li Xue Bao*.
- 17- The CAPRICORN Investigators. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet*. 2001; 357: 1385-90.
- 18- Elenkov Ilia J., Wilder Ronald L., Chrousos George P., Vizi E. Sylvester 1 The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System *Pharmacol Rev* 52:595–638, 2000
- 19- Farmer P, Pugin J beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Oct;279(4):L675-82.

- 20- Kavelaars A, van de Pol M, Zijlstra J, Heijnen CJ Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol.* 1997 Aug;77(2):211-6.
- 21- Szelenyi J, Selmeczy Z, Brozik A, Medgyesi D, Magocsi M. Dual beta-adrenergic modulation in the immune system: stimulus-dependent effect of isoproterenol on MAPK activation and inflammatory mediator production in macrophages. *Neurochem Int.* 2006 Jul;49(1):94-103. Epub 2006 Mar 3.
- 22- Grisanti LA, Evanson J, Marchus E, Jorissen H, Woster AP, DeKrey W, Sauter ER, Combs CK, Porter JE. Pro-inflammatory responses in human monocytes are beta1-adrenergic receptor subtype dependent. *Mol Immunol.* 2010 Mar;47(6):1244-54. Epub 2010 Jan 29.
- 23- Goldstein B, Kempinski MH, Stair D, Tipton RB, DeKing D, DeLong DJ, DeAsla R, Cox C, Lund N, Woolf PD. Autonomic modulation of heart rate variability during endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med.* 1995 Oct;23(10):1694-702.
- 24- Sloan RP, McCreath H, Tracey KJ, Sidney S, Liu K, Seeman T. RR interval variability is inversely related to inflammatory markers: the CARDIA study. *Mol Med.* 2007 Mar-Apr;13(3-4):178-84.
- 25- Jan BU, Coyle SM, Macor MA, Reddell M, Calvano SE, Lowry SF. Relationship of basal heart rate variability to in vivo cytokine responses after endotoxin exposure. *Shock.* 2010 Apr;33(4):363-8.
- 26- Piepoli M, Garrard CS, Kontoyannis DA, Bernardi L. Autonomic control of the heart and peripheral vessels in human septic shock. *Intensive Care Med.* 1995 Feb;21(2):112-9.
- 27- Schmidt H, Müller-Werdan U, Hoffmann T, Francis DP, Piepoli MF, Rauchhaus M, Prondzinsky R, Loppnow H, Buerke M, Hoyer D, Werdan K. Autonomic dysfunction

predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. *Crit Care Med.* 2005 Sep;33(9):1994-2002.

28- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schüler M, Pehle B, Schedlowski M, Exton MS. Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(4):214-23

29- Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R. beta-Adrenergic blockade during systemic inflammation: impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. *Resuscitation.* 2007 Feb;72(2):286-94. Epub 2006 Nov 22.

30- Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med.* 2010 Feb;38(2):388-94.

31- Hagiwara S, Iwasaka H, Maeda H, Noguchi T Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock.* 2009 May;31(5):515-20.

32- Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J. Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med.* 2005 Oct;33(10):2294-301

33- Aboab J, Sebille V, Jourdain M, Mangalaboyi J, Gharbi M, Mansart A, Annane D. Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock. *Intensive Care Med.* 2011 Aug;37(8):1344-51. Epub 2011 May 13.

34- Herndon DN, Hart DW, Wolf SE, Chinkes DL, Wolfe RR. Reversal of catabolism by beta-blockade after severe burns. *N Engl J Med.* 2001 Oct 25;345(17):1223-9.

- 35- Christensen S, Johansen MB, Tønnesen E, Larsson A, Pedersen L, Lemeshow S, Sørensen HT. Preadmission beta-blocker use and 30-day mortality among patients in intensive care: a cohort study. *Crit Care*. 2011;15(2):R87. Epub 2011 Mar 7
- 36- Noveanu M, Breidthardt T, Reichlin T, Gayat E, Potocki M, Pargger H, Heise A, Meissner J, Twerenbold R, Muravitskaya N, Mebazaa A, Mueller C. Effect of oral beta-blocker on short and long-term mortality in patients with acute respiratory failure: results from the BASEL-II-ICU study. *Crit Care*. 2010;14(6):R198. Epub 2010 Nov 3
- 37- Böhm M, Link A, Cai D, Nieminen MS, Filippatos GS, Salem R, Cohen Solal A, Huang B, Padley RJ, Kivikko M, Mebazaa A. Beneficial association of  $\beta$ -blocker therapy on recovery from severe acute heart failure treatment: data from the Survival of Patients With Acute Heart Failure in Need of Intravenous Inotropic Support trial. *Crit Care Med*. 2011 May;39(5):940-4
- 38- Gore DC, Wolfe RR. Hemodynamic and metabolic effects of selective beta1 adrenergic blockade during sepsis. *Surgery*. 2006 May;139(5):686-94.
- 39- Teboul JL; groupe d'experts de la SRLF. SRLF experts recommendations: Indicators of volume resuscitation during circulatory failure. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2005 May;24(5):568-76.
- 40- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1043-65.
- 41- Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med*. 1981 Aug;9(8):591-7.
- 42- Jackson GG, Arana-Sialer JA, Andersen BR, Griebble HG, McCabe Wrackson GG,

Profiles of pyelonephritis. Arch Intern Med. 1962 Nov;110:63-75.

43- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. JAMA. 1993 Dec 22-29;270(24):2957-63.

44- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996 Jul;22(7):707-10.

45- Balik M, Rulisek J, Leden P, Zakharchenko M, Otahal M, Bartakova H, Korinek J. Concomitant use of beta-1 adrenoreceptor blocker and norepinephrine in patients with septic shock. Wien Klin Wochenschr 2012;124:552-556.

46- Nikolaou NI, Koutouzis MJ, Christou A, Fournarakis GM, Patsilinakos SP, Rompola A, Maisel AS. B-type natriuretic peptide blood levels identify patients with non-ST elevation acute coronary syndromes at high risk for complications during intravenous beta-blocker infusion. Acute Card Care. 2011 Sep;13(3):129-35.

47- Koutouzis M, Nikolidakis S, Grigoriadis A, Koutsogeorgis D, Kyriakides ZS. Intravenous esmolol is well tolerated in elderly patients with heart failure in the early phase of non-ST elevation myocardial infarction. Drugs Aging. 2006;23(8):673-80.

## 15. LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Définitions du sepsis sévère et du choc septique
- ~~Annexe 2 : Méthodologie de la translocation nucléaire de NFκB~~
- Annexe 3 : Méthodologie des dosages biologiques
- Annexe 4 : Score de Knaus/ Score de Mac Cabe
- Annexe 5 : Index de gravité simplifié (IGS II)
- Annexe 6 : Score de défaillances viscérales SOFA
- Annexe 7 : Formulaire de déclaration des évènements indésirables graves
- Annexe 8 : Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale
- Annexe 9 : Spectroscopie de proche infrarouge
- Annexe 10 : OPS (orthogonal polarization spectral)
- Annexe 11 : Données recueillies dans le CRF

## Annexe 1 : Définitions du sepsis sévère et du choc septique

Le sepsis est défini par :

1- un ou plusieurs foyers infectieux, probables ou documentés

2- un syndrome de réponse systémique à l'infection se manifestant par au moins deux des critères suivants :

- . Température > 38°C ou < 36°C,
- . Fréquence cardiaque  $\geq$  90/min,
- . Fréquence respiratoire > 20/min et PaCO<sub>2</sub> < 32 mm Hg ou ventilation mécanique,
- . Globules blancs > 12 000/mm<sup>3</sup> ou < 4 000/mm<sup>3</sup>, et/ou myélocytose supérieure à 10%

Le sepsis sévère est défini par l'existence d'un sepsis associé à une dysfonction d'organe définie par au moins un des critères suivants :

- . Marbrures
- . Rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>  $\leq$  300 (si ventilation mécanique),
- . Oligurie < 0,5 ml/Kg/h ou < 30 ml/h (persistant au moins 1 h),
- . Lactate  $\geq$  2 mmol/l,
- . Thrombopénie < 100 000/mm<sup>3</sup>
- . Confusion, agitation
- . Dysfonction cardiaque (échographie)

Le choc septique est défini par l'existence d'un sepsis sévère associé à une instabilité hémodynamique définie par :

- . Une hypotension artérielle (PAS < 60 mm Hg ou 80 mmHg si il existe des antécédents d'hypertension artérielle) après 20-30ml/kg de macromolécule ou 40-60 ml/kg de sérum salé nécessitant donc l'introduction de vasopresseurs

**Ref : Annane D, Bellissant E, Cavillon JM. Septic shock. Lancet. 2005 Jan 1-7;365(9453):63-78.**



## **Annexe 2 : Méthodologie des dosages biologiques**

### **Concentrations de cytokines pro et anti-inflammatoires :**

Pour le dosage des cytokines, les échantillons de sang seront centrifugés à 2500 tours par minute pendant 10 min à 4°C puis conservés à -80°C pour la mesure des cytokines. La méthode utilisée est une méthode immuno-enzymatique (Immunoassay Kit, Biosource International, CA) de type sandwich. Succinctement, après incubation du sérum dans un micro puit revêtu d'anticorps dits de capture, des anticorps spécifiques de détection pour chaque cytokine conjugués à un marqueur enzymatique seront ensuite ajoutés. Les anticorps de détection se lient alors aux différentes cytokines. Après une étape de lavage, le substrat est ajouté et réagit (réaction colorimétrique) avec le marqueur enzymatique lié à la protéine. Onze cytokines seront dosées : TNF, IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), MIP-2, E-selectin, P-selectin, ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). Une étude en cours de publication réalisée au sein de notre laboratoire a identifié dans un modèle murin de choc septique que ces cytokines étaient particulièrement sensibles à l'utilisation de d'esmolol.

Cette étude permettra de préciser l'action de l'esmolol sur la réponse inflammatoire humaine au cours du choc septique.

### **Annexe 3 : Score de Knaus/ Score de Mac Cabe**

#### **CLASSIFICATION DE KNAUS**

**STADE D**            **restriction majeure d'activité due à une maladie, y compris les patients grabataires ou hospitalisés au long cours :**

- le patient voit-il chaque semaine son médecin ?
- le patient est-il incapable d'avoir une activité professionnelle du fait de sa maladie ?
- le patient est-il grabataire ou hospitalisé au long cours à cause de sa maladie ?
- le patient a-t-il présenté une rechute après une chimiothérapie anticancéreuse ?

**STADE C**            **maladie chronique provoquant une restriction d'activité importante mais non totale :**

- le patient est-il limité dans son activité journalière ?
- les symptômes apparaissent-ils lors d'un effort anodin ?
- le patient a-t-il déjà reçu un traitement anticancéreux ?
- le patient est-il sous hémodialyse périodique ?

**STADE B**            **limitation modérée ou moyenne de l'activité du fait de la maladie (activités professionnelles limitées) :**

- le patient voit-il son médecin chaque année ?
- le patient prend-il un traitement de façon permanente ?
- le patient a-t-il une limitation modérée de ses activités du fait de la maladie ?
- le patient est-il atteint d'un diabète sucré, d'une insuffisance rénale chronique, d'une maladie hémorragique ou d'une anémie chronique ?

**STADE A**            **bonne santé, pas de limitation d'activité :**

- Réponses négatives à toutes les questions citées ci-dessus

**➔ STADE selon KNAUS (reporter A, B, C ou D) :**

#### **CLASSIFICATION DE MacCABE : MALADIE CHRONIQUE PRÉALABLE**

- 0**        absence de maladie sous-jacente ou maladies sous-jacentes n'affectant pas le pronostic vital.
- 1**        maladies sous-jacentes mettant en jeu le pronostic vital sur un délai apprécié de 5 ans.
- 2**        maladies sous-jacentes estimées fatales en 1 an.

**➔ STADE selon Mc Cabe (reporter 0,1 ou 2) :**

***Ref : Knaus et al. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation : a physiologically based classification system. Crit Car Med .1981***

### Annexe 4 : Index de gravité simplifié (IGS II)

VARIABLES	1.1.1.1.1 Simplified Acute Physiology Score II						POINTS
Age, a <b>Points</b>	< 40 <b>0</b>	40-59 <b>7</b>	60-69 <b>12</b>	70-74 <b>15</b>	75-79 <b>16</b>	>80 <b>18</b>	/-/-/
Fréquence cardiaque, c/min <b>Points</b>	< 40 <b>11</b>	40-69 <b>2</b>	70-119 <b>0</b>	120-159 <b>4</b>	160 <b>7</b>		/-/-/
PB Systolique, mmHg <b>Points</b>	< 70 <b>13</b>	70-99 <b>5</b>	100-199 <b>0</b>	≥200 <b>2</b>			/-/-/
Température, °C <b>Points</b>	< 39° <b>0</b>	≥ 39° <b>3</b>					/-/-/
(Si VM ou VNI) PaO <sub>2</sub> mmHg /F <sub>I</sub> O <sub>2</sub> <b>Points</b>	< 100 <b>11</b>	100-199 <b>9</b>	≥ 200 <b>6</b>				/-/-/
Diurèse, liter/24h <b>Points</b>	< 0.500 <b>11</b>	0.500-0.999 <b>4</b>	≥1.000 <b>0</b>				/-/-/
Urée, mmol/litre <b>Points</b>	< 10.0 <b>0</b>	10.0-29.9 <b>6</b>	≥30.0 <b>10</b>				/-/-/
GB, 10 <sup>9</sup> /liter <b>Points</b>	<1.0 <b>12</b>	1.0-19.9 <b>0</b>	≥20.0 <b>3</b>				/-/-/
K <sup>+</sup> , mmol/litre <b>Points</b>	< 3.0 <b>3</b>	3.0-4.9 <b>0</b>	≥5.0 <b>3</b>				/-/-/
Na <sup>+</sup> , mmol/litre <b>Points</b>	< 125 <b>5</b>	125-144 <b>0</b>	≥145 <b>1</b>				/-/-/
Bicarbonate, mmol/litre <b>Points</b>	< 15 <b>6</b>	15-19 <b>3</b>	≥20 <b>0</b>				/-/-/
Bilirubine, µmol/litre (mg/liter) <b>Points</b>	< 68.4 (< 4.0) <b>0</b>	68.4-102.5 (4.0-5.9) <b>4</b>	≥102.6 (≥6.0) <b>9</b>				/-/-/
Score de Glasgow <b>Points</b>	<6 <b>26</b>	6-8 <b>13</b>	9-10 <b>7</b>	11-13 <b>5</b>	14-15 <b>0</b>		/-/-/
Maladie Chronique <b>Points</b>	Cancer Metastasé <b>9</b>	Hemopathie maligne <b>10</b>	SIDA <b>17</b>				/-/-/
Type d'admission <b>Points</b>	Chirurgie Programmée <b>0</b>	Médicale <b>6</b>	Chirurgie Non programmée <b>8</b>				/-/-/
						<b>TOTAL IGS II</b>	/-/-/-/

***Ref: Le Gall et al. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. JAMA 1993.***

## Annexe 5 : Score de défaillances viscérales SOFA

SCORE DE SOFA	1	2	3	4
<b>RESPIRATION</b> PaO <sub>2</sub> /F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	<400	<300	<200*	<100*
<b>COAGULATION</b> Plaquettes 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	<150	<100	<50	<20
<b>FOIE</b> Bilirubine, mg/dl (μmol/l)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (>204)
<b>CARDIOVASCULAIRE</b> Hypotension	PAM<70 mmHg	Dopa ≤5 ou Dobutamine	Dopa >5 ou epinephrine ou norepinephrine ≤0,1	Dopa >15 ou epinephrine ou norepinephrine >0,1
<b>NEUROLOGIQUE</b> Glasgow	13-14	10-12	6-9	<6
<b>RENAL</b> Créatinine, mg/dl (μmol/l) ou débit urinaire	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440) ou < 500 ml/j	>5,0 (>440) ou <200 ml/j

### Score de Glasgow

<b>Ouverture des yeux</b>		<b>1.1.1.1.2 Réponse motrice</b>		<b>Réponse verbale</b>	
Spontanée	<input type="checkbox"/> 4 points	sur commande	<input type="checkbox"/> 6 points	claire	<input type="checkbox"/> 5 points
à l'appel	<input type="checkbox"/> 3 points	aux stimuli nociceptifs		confuse	<input type="checkbox"/> 4 points
à la douleur	<input type="checkbox"/> 2 points	localisatrice	<input type="checkbox"/> 5 points	incohérente	<input type="checkbox"/> 3 points
Aucune	<input type="checkbox"/> 1 point	évitement	<input type="checkbox"/> 4 points	incompréhensible	<input type="checkbox"/> 2 points
		flexion inadaptée	<input type="checkbox"/> 3 points	aucune	<input type="checkbox"/> 1 point
		extension	<input type="checkbox"/> 2 points		
		aucune	<input type="checkbox"/> 1 point		

➔ Score de Glasgow (somme des points) : /\_/\_/

**Ref: Vincent et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996**

**Annexe 6 : Formulaire de déclaration des évènements indésirables graves**  
**En cours**

## **Annexe 7: Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale**

### **PRINCIPES ETHIQUES APPLICABLES AUX RECHERCHES MEDICALES SUR DES SUJETS HUMAINS**

Adoptée par la 18e Assemblée générale de l'AMM, Helsinki, Finlande, Juin 1964 et amendée par les

- 29e Assemblée générale de l'AMM, Tokyo, Octobre 1975
- 35e Assemblée générale de l'AMM, Venise, Octobre 1983
- 41e Assemblée générale de l'AMM, Hong Kong, Septembre 1989
- 48e Assemblée générale de l'AMM, Somerset West (Afrique du Sud), Octobre 1996
- 52e Assemblée générale de l'AMM, Edimbourg, Ecosse, Octobre 2000
- 53e Assemblée générale de l'AMM, Washington, Etats Unis, 2002 (ajout d'une note de clarification pour le paragraphe 29)
- 55e Assemblée générale de l'AMM, Tokyo, Japon 2004 (ajout d'une note de clarification concernant le paragraphe 30)
- 59e Assemblée générale de l'AMM, Séoul, Corée, Octobre 2008

#### **A. INTRODUCTION**

1. L'Association Médicale Mondiale (AMM) a élaboré la Déclaration d'Helsinki comme un énoncé de principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains, y compris la recherche sur du matériel biologique humain et sur des données identifiables.

La Déclaration est conçue comme un tout indissociable. Aucun paragraphe ne peut être appliqué sans tenir compte de tous les autres paragraphes pertinents.

2. Cette Déclaration s'adresse principalement aux médecins. L'AMM invite cependant les autres participants à la recherche médicale impliquant des êtres humains à adopter ces principes.
3. Le devoir du médecin est de promouvoir et de sauvegarder la santé des patients, y compris celles des personnes impliquées dans la recherche médicale. Le médecin consacre son savoir et sa conscience à l'accomplissement de ce devoir.
4. La Déclaration de Genève de l'AMM engage les médecins en ces termes: "La santé de mon patient prévaudra sur toutes les autres considérations" et le Code International d'Ethique Médicale déclare qu'un "médecin doit agir dans le meilleur intérêt du patient lorsqu'il le soigne".
5. Le progrès médical est basé sur la recherche qui, en définitive, doit comprendre des études impliquant des êtres humains. Des possibilités appropriées de participer à la recherche médicale devraient être offertes aux populations qui y sont sous- représentées.

6. Dans la recherche médicale impliquant des êtres humains, le bien-être de chaque personne impliquée dans la recherche doit prévaloir sur tous les autres intérêts.
7. L'objectif premier de la recherche médicale impliquant des êtres humains est de comprendre les causes, le développement et les effets des maladies et d'améliorer les interventions préventives, diagnostiques et thérapeutiques (méthodes, procédures et traitements). Même les meilleures interventions courantes doivent être évaluées en permanence par des recherches portant sur leur sécurité, leur efficacité, leur pertinence, leur accessibilité et leur qualité.
8. Dans la pratique médicale et la recherche médicale, la plupart des interventions comprennent des risques et des inconvénients.
9. La recherche médicale est soumise à des normes éthiques qui promeuvent le respect de tous les êtres humains et qui protègent leur santé et leurs droits. Certaines populations faisant l'objet de recherches sont particulièrement vulnérables et ont besoin d'une protection spéciale. Celles-ci incluent les personnes qui, d'elles-mêmes, ne sont pas en mesure de donner ou de refuser leur consentement et celles qui peuvent être vulnérables à la coercition ou à des influences indues.
10. Dans la recherche médicale impliquant des êtres humains, les médecins devraient tenir compte des normes et standards éthiques, légaux et réglementaires applicables dans leur propre pays ainsi que des normes et standards internationaux. Les protections garanties par la présente Déclaration aux personnes impliquées dans la recherche ne peuvent être restreintes ou exclues par aucune disposition éthique, légale ou réglementaire, nationale ou internationale.

## **B. PRINCIPES APPLICABLES A TOUS LES TYPES DE RECHERCHE MEDICALE**

11. Il est du devoir des médecins participant à la recherche médicale de protéger la vie, la santé, la dignité, l'intégrité, le droit à l'auto-détermination, la vie privée et la confidentialité des informations des personnes impliquées dans la recherche.
12. La recherche médicale impliquant des êtres humains doit se conformer aux principes scientifiques généralement acceptés, se baser sur une connaissance approfondie de la littérature scientifique, sur d'autres sources pertinentes d'informations et sur des expériences appropriées en laboratoire et, le cas échéant, sur les animaux. Le bien être des animaux utilisés dans la recherche doit être respecté.
13. Une prudence particulière s'impose dans la conduite de recherches susceptibles de nuire à l'environnement.
14. La conception et la conduite de toutes les études impliquant des êtres humains doivent être clairement décrites dans un protocole de recherche. Ce protocole devrait contenir une déclaration sur les enjeux éthiques en question et indiquer comment les principes de la présente Déclaration ont été pris en considération. Le protocole devrait inclure des informations concernant le financement, les promoteurs, les affiliations institutionnelles, d'autres conflits d'intérêts potentiels, les incitations pour les personnes impliquées dans la recherche et les mesures prévues pour soigner et/ou dédommager celles ayant subi un préjudice en raison de leur participation à l'étude. Le protocole devrait mentionner les dispositions prévues après l'étude afin d'offrir aux personnes impliquées un accès aux interventions identifiées comme bénéfiques dans le cadre de l'étude ou à d'autres soins ou bénéfices appropriés.



15. Le protocole de recherche doit être soumis à un comité d'éthique de la recherche pour évaluation, commentaires, conseils et approbation avant que l'étude ne commence. Ce comité doit être indépendant du chercheur, du promoteur et de toute autre influence indue. Il doit prendre en considération les lois et réglementations du ou des pays où se déroule la recherche, ainsi que les normes et standards internationaux, mais ceux-ci ne doivent pas permettre de restreindre ou exclure l'une des protections garanties par la présente Déclaration aux personnes impliquées dans la recherche. Le comité doit avoir un droit de suivi sur les études en cours. Le chercheur doit fournir au comité des informations sur le suivi, notamment concernant tout événement indésirable grave. Aucune modification ne peut être apportée au protocole sans évaluation et approbation par le comité.
16. La recherche médicale impliquant des êtres humains doit être conduite uniquement par des personnes scientifiquement qualifiées et expérimentées. La recherche impliquant des patients ou des volontaires en bonne santé nécessite la supervision d'un médecin ou d'un autre professionnel de santé qualifié et compétent. La responsabilité de protéger les personnes impliquées dans la recherche doit toujours incomber à un médecin ou à un autre professionnel de santé et jamais aux personnes impliquées dans la recherche même si celles-ci ont donné leur consentement.
17. La recherche médicale impliquant une population ou une communauté défavorisée ou vulnérable se justifie uniquement si la recherche répond aux besoins et priorités sanitaires de cette population ou communauté et si, selon toute vraisemblance, les résultats de la recherche seront bénéfiques à cette population ou communauté.
18. Toute recherche médicale impliquant des êtres humains doit préalablement faire l'objet d'une évaluation soigneuse des risques et des inconvénients prévisibles pour les personnes et les communautés impliquées dans la recherche, par rapport aux bénéfices prévisibles pour elles et les autres personnes ou communautés affectées par la pathologie étudiée.
19. Tout essai clinique doit être enregistré dans une banque de données accessible au public avant que ne soit recruté la première personne impliquée dans la recherche.
20. Les médecins ne sont pas autorisés à participer à une recherche impliquant des êtres humains sans avoir la certitude que les risques inhérents ont été correctement évalués et pourront être gérés de manière satisfaisante. Les médecins doivent cesser immédiatement une étude dès que les risques s'avèrent dépasser les bénéfices potentiels ou dès l'instant où des résultats positifs et bénéfiques ont été démontrés.
21. Une recherche médicale impliquant des êtres humains ne peut être conduite que si l'importance de l'objectif dépasse les risques et inconvénients inhérents pour les personnes impliquées dans la recherche.
22. La participation de personnes capables à une recherche médicale doit être un acte volontaire. Bien qu'il puisse être opportun de consulter les membres de la famille ou les responsables de la communauté, aucune personne capable ne peut être impliquée dans une étude sans qu'elle ait donné librement son consentement.
23. Toutes les précautions doivent être prises pour protéger la vie privée et la confidentialité des informations personnelles concernant les personnes impliquées dans la recherche, et pour minimiser l'impact de l'étude sur leur intégrité physique, mentale et sociale.

24. Dans la recherche médicale impliquant des personnes capables, toute personne pouvant potentiellement être impliquée dans la recherche doit être correctement informé des objectifs, des méthodes, des sources de financement, de tout éventuel conflit d'intérêts, des affiliations institutionnelles du chercheur, des bénéfices escomptés et des risques potentiels de l'étude, des désagréments qu'elle peut engendrer et de tout autre aspect pertinent de l'étude. La personne pouvant potentiellement être impliquée dans la recherche doit être informé de son droit de refuser de participer à l'étude ou de s'en retirer à tout moment sans mesure de rétorsion. Une attention particulière devrait être accordée aux besoins d'informations spécifiques de chaque personne pouvant potentiellement être impliquée dans la recherche ainsi qu'aux méthodes adoptées pour fournir les informations. Lorsque le médecin ou une autre personne qualifiée en la matière a la certitude que la personne concernée a compris les informations, il doit alors solliciter son consentement libre et éclairé, de préférence par écrit. Si le consentement ne peut pas être donné par écrit, le consentement non écrit doit être formellement documenté en présence d'un témoin.
25. Pour la recherche médicale utilisant des tissus ou des données d'origine humaine, les médecins doivent normalement solliciter le consentement pour le prélèvement, l'analyse, le stockage et/ou la réutilisation. Il peut se présenter des situations où il est impraticable, voire impossible d'obtenir le consentement ou que cela mettrait en péril la validité de la recherche. Dans de telles situations, la recherche peut être entreprise uniquement après évaluation et approbation d'un comité d'éthique de la recherche.
26. Lorsqu'il sollicite le consentement éclairé d'une personne pour sa participation à une recherche, le médecin devrait être particulièrement attentif lorsque cette dernière est dans une relation de dépendance avec lui ou pourrait donner son consentement sous la contrainte. Dans ce cas, le consentement éclairé devrait être sollicité par une personne qualifiée en la matière et complètement indépendante de cette relation.
27. Lorsque la recherche implique des personnes incapables, le médecin doit solliciter le consentement éclairé de leur représentant légal. Les personnes incapables ne doivent pas être incluses dans une étude qui n'a aucune chance de leur être bénéfique sauf si cette étude vise à améliorer la santé de la population qu'elles représentent, qu'elle ne peut pas être réalisée avec des personnes capables et qu'elle ne comporte que des risques et des inconvénients minimes.
28. Lorsqu'une personne considérée comme incapable est en mesure de donner son assentiment concernant sa participation à la recherche, le médecin doit solliciter cet assentiment en complément du consentement de son représentant légal. Le refus de la personne pouvant potentiellement être impliquée dans la recherche devrait être respecté.
29. La recherche impliquant des personnes physiquement ou mentalement incapables de donner leur consentement, par exemple des patients inconscients, peut être menée uniquement si l'état physique ou mental empêchant de donner un consentement éclairé est une caractéristique nécessaire de la population sur laquelle porte cette recherche. Dans de telles circonstances, le médecin devrait solliciter le consentement éclairé du représentant légal. En l'absence d'un représentant légal et si la recherche ne peut pas être retardée, l'étude peut être lancée sans le consentement éclairé. Dans ce cas, le protocole de recherche doit mentionner les raisons spécifiques d'impliquer des personnes dont l'état les rend

incapables de donner leur consentement éclairé et l'étude doit être approuvée par un comité d'éthique de la recherche. Le consentement pour maintenir la personne concernée dans la recherche devrait, dès que possible, être obtenu de la personne elle-même ou de son représentant légal.

30. Les auteurs, rédacteurs et éditeurs ont tous des obligations éthiques concernant la publication des résultats de recherche. Les auteurs ont le devoir de mettre à la disposition du public les résultats de leurs recherches sur les êtres humains. Ils ont la responsabilité de fournir des rapports complets et précis. Ils devraient se conformer aux directives acceptées en matière d'éthique pour la rédaction de rapports. Les résultats aussi bien négatifs et non concluants que positifs devraient être publiés ou rendus publics par un autre moyen. La publication devrait mentionner les sources de financement, les affiliations institutionnelles et les conflits d'intérêts. Les rapports de recherche non-conformes aux principes de la présente Déclaration ne devraient pas être acceptés pour publication.

### **C. PRINCIPES ADDITIONNELS POUR LA RECHERCHE MEDICALE ASSOCIEE A DES SOINS MEDICAUX**

31. Le médecin peut associer la recherche médicale à des soins médicaux uniquement dans la mesure où la recherche se justifie par sa valeur potentielle en matière de prévention, de diagnostic ou de traitement et si le médecin a de bonnes raisons de penser que la participation à l'étude ne portera pas atteinte à la santé des patients concernés.
32. Les bénéfices, les risques, les inconvénients, ainsi que l'efficacité d'une nouvelle intervention doivent être testés et comparés à ceux de la meilleure intervention courante avérée, sauf dans les circonstances suivantes :
- L'utilisation de placebo, ou le fait de ne pas administrer de traitement, est acceptable lorsqu'il n'existe pas d'intervention courante avérée; ou
  - l'utilisation d'un placebo afin de déterminer l'efficacité ou la sécurité d'une intervention est nécessaire pour des raisons de méthodologie incontournables et scientifiquement fondées, et les patients recevant le placebo ou aucun traitement ne courent aucun risque de préjudices graves ou irréversibles. Le plus grand soin doit être apporté afin d'éviter tout abus de cette option.
33. A la fin de l'étude, les patients impliqués ont le droit d'être informés des conclusions de l'étude et de profiter de tout bénéfice en résultant, par exemple, d'un accès aux interventions identifiées comme bénéfiques dans le cadre de l'étude ou à d'autres soins ou bénéfices appropriés.
34. Le médecin doit fournir des informations complètes au patient sur la nature des soins liés à la recherche. Le refus d'un patient de participer à une étude ou sa décision de s'en retirer ne doit jamais interférer avec la relation patient-médecin.
35. Dans le cadre du traitement d'un patient, faute d'interventions avérées ou faute d'efficacité de ces interventions, le médecin, après avoir sollicité les conseils d'experts et avec le consentement éclairé du patient ou de son représentant légal, peut recourir à une intervention non avérée si, selon son appréciation professionnelle, elle offre une chance de sauver la vie, rétablir la santé ou alléger les souffrances du patient. Dans toute la mesure du possible, cette intervention devrait faire l'objet d'une recherche pour en évaluer la sécurité et l'efficacité. Dans

tous les cas, les nouvelles informations devraient être enregistrées et, le cas échéant, rendues publiques.

## **Annexe 8 : Spectroscopie de proche infrarouge**

La spectroscopie de proche infrarouge (NIRS) utilise la lumière infra rouge à des longueurs d'ondes spécifiques (700-1000nm) pour illuminer de façon non invasive les tissus sous cutanés. La lumière est absorbée de façon dépendante à la quantité d'oxygène attachée à l'hémoglobine dans les artérioles, les capillaires et les veinules. La lumière non absorbée est retournée comme un signal optique puis analysée pour produire le ratio de l'hémoglobine oxygénée/hémoglobine totale exprimée comme StO<sub>2</sub>% (valeur normale 70%).



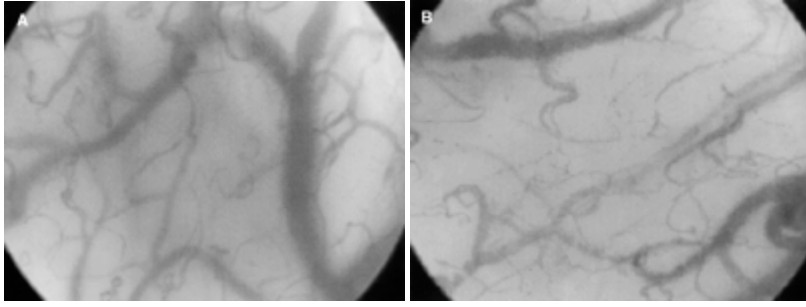
The depth of tissue measured by the **InSpectra** oxygen saturation monitor is directly related to the distance between the illumination fibers and detection fibers: studies have shown that with 25 mm optical probe spacing, approximately 95% of the detected optical signal is from a depth of 0 - 23 mm.

## **Annexe 9 : OPS (orthogonal polarization spectral)**

Une lumière polarisée est utilisée pour illuminer la zone d'intérêt. Celle-ci est renvoyée par le tissu et collectée par l'objectif de la caméra. Un filtre polarisant servant d'analyseur, est placé en face de la caméra, éliminant la lumière reflétée à la surface du tissu. La lumière dépolarisée renvoyée par les tissus plus profonds passe à travers l'analyseur. Des images de contraste élevé de la microcirculation sont formées par les structures absorbantes, par exemple les microvaisseaux qui sont près de la surface et illuminés par la lumière dépolarisée venant des structures plus profondes. En raison de ces caractéristiques, cet appareil est particulièrement destiné à l'exploration des tissus protégés par une fine couche épithéliale comme les surfaces muqueuses. Les hématies apparaissent en noir, les globules blancs et les plaquettes sont parfois visibles. Cependant les parois vasculaires ne sont pas visibles et de ce fait ne deviennent visible que lorsqu'ils contiennent des hématies. Chez les patients de réanimation, la muqueuse sous linguale est la plus investiguée. On peut aussi l'utiliser sur d'autres muqueuses digestives lorsqu'elles sont accessibles (iléostomie, colostomie). De Backer et al utilisant l'OPS sur la muqueuse linguale de patients en choc septiques ont montré que ces patients avaient une baisse de la densité capillaire et diminution du nombre de capillaire perfusés.

OPS : patient sain à gauche et patient en choc septique à droite. A noter la baisse de densité des petits vaisseaux. La cinétique est visible sur le lien Internet suivant

<http://www.cytometrics.com/seeing6.htm>



## **Annexe 10 : Données recueillies dans le CRF**

### **AU COURS DE LA PERIODE H0, LES PARAMETRES SUIVANTS SERONT SAISIS :**

#### **Les paramètres démographiques et anamnestiques**

1. L'âge, le sexe, le poids et taille,
2. La date d'entrée dans le service et l'origine du patient : ville, hôpital ou institution,
3. L'état de santé antérieur : score de Knaus [41] et indice de Mac Cabe [42] (Annexe 4),
4. Diagnostic principal et motif d'admission,
5. L'origine la plus probable du sepsis,
6. L'IGS II à l'admission [43] (Annexe 5),
7. Le nombre de défaillances viscérales évalué par le score de SOFA à l'admission [44] (Annexe 6).

#### **Les informations relatives à l'état clinique du patient à l'inclusion**

1. L'IGS II [43],
2. Le nombre de défaillances viscérales évalué par le score de SOFA [44] (Annexe 6),
3. Date et heure de mise en place de la ventilation,
4. Les réglages de la ventilation (mode, volume courant, aide inspiratoire, trigger, pression expiratoire positive, FiO<sub>2</sub>, fréquence respiratoire); les paramètres de surveillance (ventilation minute, pression de plateau, pression maximale),

#### **Les paramètres hémodynamiques**

1. Fréquence cardiaque à H0,
2. Pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD), PAM à H0,



3. Index cardiaque à H0 (Thermodilution transpulmonaire PiCCO) et paramètres issus de la mesure PICCO fournis par la machine (eau pulmonaire, FE, IFC, variation de la pression pulsée)
4. Diurèse horaire à H0
5. ScVO2
6. Paramètres NIRS, Limon et OPS

**Les informations relatives aux traitements en cours**

1. Le débit de noradrénaline en microgrammes/kg/min,
2. Le débit de dobutamine en microgrammes/kg/min,
3. Le débit d'hypnovel en mg/kg/h,
4. Le débit de sufentanyl en microgrammes/ kg/h,

**AU COURS DE LA PERIODE H1, LES PARAMETRES SUIVANTS SERONT SAISIS :**

**Les informations relatives à l'état clinique du patient**

7. Fréquence cardiaque à H1,
8. Pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD), PAM à H1,
9. Index cardiaque à H1 (Thermodilution transpulmonaire PiCCO) et paramètres issus de la mesure PICCO fournis par la machine (eau pulmonaire, FE, IFC, variation de la pression pulsée)
10. Diurèse pendant la première heure à H1,
11. ScVO2

**Les informations relatives aux traitements en cours**

1. Dose cumulée d'esmolol utilisée entre H0 et H1,

2. Dose cumulée de noradrénaline utilisée entre H0 et H1,
3. Dose cumulée de dobutamine utilisée entre H0 et H1,
4. Volume et nature de remplissage vasculaire utilisé entre H0 et H1,
5. Dose cumulée d'hypnovel utilisée entre H0 et H1,
6. Dose cumulée de sufentanyl utilisée entre H0 et H1.

**AU TERME DE CHAQUE HEURE (H2 H3 H4 H5), LES PARAMETRES SUIVANTS SERONT**

**SAISIS:**

**Les informations relatives à l'état clinique du patient**

1. Fréquence cardiaque de H2 à H6,
2. PAS- PAD- PAM de H2 à H6,
3. Index cardiaque de H2 à H6 (Thermodilution transpulmonaire Picco),
4. Diurèse pendant la première heure de H2 à H6,
5. ScVO2

**Les informations relatives aux traitements en cours**

1. Dose cumulée d'esmolol utilisée durant chaque heure de H2 à H6,
2. Dose cumulée de noradrénaline utilisée durant chaque heure de H2 à H6,
3. Dose cumulée de dobutamine utilisée durant chaque heure de H2 à H6,
4. Volume et nature de remplissage vasculaire utilisé durant chaque heure de H2 à H6,
5. Dose cumulée d'hypnovel utilisée durant chaque heure de H2 à H6,
6. Dose cumulée de sufentanyl utilisée durant chaque heure de H2 à H6.

**AU COURS DE LA PERIODE H6 :** Les paramètres recueillis sont les mêmes que à H0



## RESUME

**Introduction :** Malgré une réanimation bien conduite, un certain nombre de patients en choc septique présentent une tachycardie persistante. Dans ce contexte, cette élévation de la fréquence cardiaque peut être le reflet d'un certain degré de dysautonomie. L'objectif de cette thèse est d'évaluer, sur un modèle expérimental de choc septique, l'impact d'un ralentissement de la fréquence cardiaque soit par un  $\beta$ -bloquant cardiosélectif aux effets anti inflammatoires (esmolol, travail 1) soit par l'ivabradine, un inhibiteur des canaux *if* sans effets anti-inflammatoires majeurs en situation aiguë, (travail 2) sur les fonctions cardiaque, vasculaire et le profil inflammatoire systémique et tissulaire.

**Matériels et Méthodes :** Le choc septique était induit par une ligature et ponction cœcale (CLP) chez des rats Wistar. Les rats du travail 1 étaient randomisés à 4 heures de la chirurgie dans les groupes : Contrôle, Esmolol (débuté à 4 heures), Noradrénaline (débuté à 18 heures), Esmolol + Noradrénaline. Les rats du travail 2 étaient randomisés à 4 heures de la chirurgie dans les groupes Contrôle, Ivabradine (débutée à 4 heures). Un groupe Sham était réalisé dans chaque travail. Les évaluations étaient réalisées à 18 heures de la chirurgie et portaient sur la fonction cardiaque (micro PET et Millar pour le travail 1, échocardiographie pour le travail 2) *in vivo*, *ex vivo* sur la vasoréactivité (par myographie) ainsi que sur les profils inflammatoires systémique et tissulaire (cardiaque et vasculaire).

**Résultats :** Dans les deux travaux, comparé au groupe Sham, la CLP induisait un tableau de choc septique incluant dysfonction cardiaque et hypovascularéactivité aux vasopresseurs. Dans le travail 1, l'adjonction d'esmolol réduisait la fréquence cardiaque et améliorait l'inotropisme myocardique ainsi que la vasoréactivité mésentérique. Ces effets étaient associés à une réduction des cytokines inflammatoires systémiques et à une diminution de l'expression de NF- $\kappa$ B dans le cœur et les vaisseaux. Dans le travail 2, l'ivabradine réduisait aussi efficacement la fréquence cardiaque mais sans aucun impact sur la fonction myocardique ou la vasoréactivité. Aucun effet n'était retrouvé sur les mêmes paramètres inflammatoires.

**Conclusion :** Dans le choc septique expérimental, l'adjonction d'un traitement  $\beta$ -bloquant permet une amélioration des fonctions cardiaques et vasculaires *via* des effets anti-inflammatoires. Néanmoins, la réduction isolée de la fréquence cardiaque semble n'apporter aucun bénéfice en termes de fonction cardiovasculaire ainsi que sur les paramètres inflammatoires. L'objectif de réduction systématique de la fréquence cardiaque n'apparaît donc pas comme un objectif intéressant dans la prise en charge du choc septique et les effets bénéfiques de l'Esmolol sont essentiellement anti-inflammatoires.

Mots clefs : Choc septique, esmolol, ivabradine, fonction cardiaque, vasoréactivité, inflammation

## ABSTRACT

**Introduction:** Despite adequate initial resuscitation, some septic shock patients continue to display persistent tachycardia likely due to autonomic dysregulation. The purpose of the present study was to determine the consequences of heart rate reduction by a  $\beta$ -blocker (study 1) or by Ivabradine (study 2) on cardiac function, vasoreactivity and inflammatory pattern in an experimental model of septic shock.

**Material and Methods:** Septic shock was induced in Wistar rats by cecal ligation and puncture. In the first study, four hours after the surgery, Wistar rats were randomly allocated to the following groups: control, esmolol, norepinephrine (started at H18), and esmolol (started at H4) + norepinephrine (started at H18). In the second study, four hours after the surgery, Wistar rats were randomly allocated to the following groups: Control and Ivabradine (administered *per os* four hours after the surgery). A Sham-operated group was included in each study. Assessment at 18 hours included hemodynamics, *in vivo* cardiac function (by Micro-PET and Millar in study 1 and echocardiography in study 2) and *ex vivo* vasoreactivity by myography. Circulating cytokine levels were measured by ELISA while cardiac and vascular inflammatory protein expressions were assessed by Western blotting.

**Results:** In both studies compared to sham animals, CLP animals developed hypotension, cardiac depression and vascular hyporesponsiveness to vasopressor treatment. In study 1, esmolol infusion decreased the heart rate with increased cardiac contractility and restored mesenteric vasoreactivity. These effects were associated with a decrease in systemic inflammatory cytokines as well as NF- $\kappa$ B activation both at the cardiac and vessel level. In study 2, compared to the CLP group, adjunction of Ivabradine also decreased the heart rate but without any impact on cardiac contractility or vasoreactivity. Adjunction of Ivabradine to CLP rats had no impact on the same tested inflammatory parameters.

**Conclusion:** Adjunction of selective  $\beta$ 1-blockade in experimental septic shock enhances cardiac contractility and vascular responsiveness to catecholamines whereas isolated heart rate reduction by Ivabradine does not. These protective cardiovascular effects in study 1 appear to be attributed to the anti-inflammatory effects of esmolol while in study 2, Ivabradine does not affect any of the above parameters. It is likely that heart rate reduction is not a promising target in septic shock and that the observed benefits of esmolol are mostly likely attributable to its anti-inflammatory effects.

Keywords: Septic shock, Esmolol, Ivabradine, cardiac function, vasoreactivity, inflammation