



**HAL**  
open science

# Hyperperméabilité capillaire au cours des états septiques : nouvelles cibles thérapeutiques et place du lactate de sodium molaire.

Emmanuel Besnier

► **To cite this version:**

Emmanuel Besnier. Hyperperméabilité capillaire au cours des états septiques : nouvelles cibles thérapeutiques et place du lactate de sodium molaire.. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR112 . tel-03437616

**HAL Id: tel-03437616**

**<https://theses.hal.science/tel-03437616>**

Submitted on 20 Nov 2021

**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.

# THESE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité** Sciences de la Vie et de la Santé

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Hyperperméabilité capillaire au cours des états septiques : nouvelles cibles thérapeutiques et place du lactate de sodium molaire**

**Présentée et soutenue par  
Emmanuel BESNIER**

**Thèse soutenue publiquement le 6 Mai 2020  
devant le jury composé de**

Pr Bruno Levy	PUPH – Université de Nancy	Rapporteur
Pr Muriel Fartoukh	PUPH – Université Paris Descartes	Rapporteur
Pr Raphael Favory	PUPH – Université de Lille	Examineur
Pr Benoit Veber	PUPH – Université de Rouen	Examineur
Pr Vincent Richard	PUPH – Université de Rouen	Examineur
Pr Fabienne Tamion	PUPH – Université de Rouen	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par Fabienne TAMION laboratoire INSERM U1096 - EnVI**



**Inserm U1096**  
Endothelium, Valvulopathy & Heart Failure

## Résumé

Le sepsis concerne des millions de patients dans le monde et engendre une mortalité importante. La pénétration de l'agent pathogène est responsable d'un ensemble de réactions de l'hôte, avec une altération de grandes fonctions de l'organisme pouvant conduire à la défaillance d'organe. L'endothélium est un élément majeur du système cardiovasculaire assurant notamment la perfusion tissulaire et la régulation des flux hydrosodés entre les secteurs vasculaire et interstitiel. Au cours du sepsis une altération de cet endothélium peut survenir et induire un défaut de microcirculation et une fuite capillaire par altération de la fonction barrière, conduisant à l'hypoxie cellulaire et au syndrome oedémateux.

Ce travail de doctorat se divise en une approche clinique évaluant l'effet du syndrome oedémateux sur le pronostic des patients de réanimation, et une approche expérimentale évaluant les effets de nouvelles thérapies sur cet aspect de la fonction endothéliale.

Dans la première partie, nous avons identifié que la balance hydrique positive (entrées – sorties de fluides) était associée à la mortalité de patients critiques admis pour assistance circulatoire par ExtraCorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) veino-artérielle dans le cadre d'un choc cardiogénique réfractaire. Ceci confirmait des résultats précédents chez les patients septiques et illustre que ce phénomène concernait également des patients critiques non septiques.

Dans la deuxième partie, nous avons évalué dans un premier temps l'effet d'un anticorps anti-VEGF, le bevacizumab, dans un modèle de sepsis par ponction ligature caecale chez la souris. Le VEGF est impliqué dans les phénomènes de fuite paracellulaire et des auteurs avaient préalablement montré un effet bénéfique du bevacizumab sur la fuite capillaire dans le sepsis. Nous n'avons retrouvé aucune modification de la mortalité, malgré un effectif conséquent ( $n > 50$ ), ne justifiant pas la poursuite des investigations. Nous avons ensuite évalué les effets du lactate de sodium molaire (LSM), fluide hypertonique et énergétique ayant suggéré récemment un effet bénéfique sur la macro et la microcirculation dans un modèle endotoxinique, avec notamment une réduction de la balance hydrique. A cette fin nous avons réalisé un modèle de sepsis chez le rat. L'administration continue de LSM induisait une amélioration de la perfusion tissulaire intestinale (microcirculation) et réduisait la fuite capillaire dans l'intestin, le poumon et le foie en comparaison avec le NaCl 0,9%. De plus le LSM réduisait l'inflammation (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10) et les taux de VEGF-A, et améliorait la fonction cardiaque (échocardiographie : débit cardiaque, fraction de raccourcissement ; cathétérisme cardiaque gauche : pente maximale systolique et compliance ventriculaire). La perfusion de LSM induisait une augmentation de la lactatémie et de la pyruvatémie sans modification du ratio, témoin de la métabolisation du lactate perfusé, avec augmentation de la glycémie (néoglucogénèse) et de l'hydroxybutyrate, suggérant fortement un effet métabolique de sa perfusion.

Ainsi le LSM pourrait être un fluide novateur au cours du sepsis et nécessite d'être évalué au cours d'essais cliniques chez l'Homme

## Remerciements

Je tiens à remercier les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire, d'évaluer et de juger ce travail.

Merci aux Pr Levy et Fartoukh d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci au Pr Favory d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci également de nous avoir ouvert les possibilités de collaboration sur le thème du lactate de sodium molaire et pour toutes les discussions passionnantes.

Je remercie le Pr Tamion pour m'avoir encadré pendant toute la durée de ce doctorat, pour son enthousiasme communicatif et sa disponibilité. Merci pour ses encouragements, son positivisme, sa bienveillance et pour tous les projets passés, en cours et à venir. A nos longues discussions dans ton bureau.

Je remercie le Pr Richard, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli dans son unité, pour son aide et ses orientations ayant permis l'avènement de ce travail.

Un grand merci au Pr Mulder pour son aide du quotidien tant technique qu'intellectuelle, sa grande connaissance fondamentale et pragmatique de la physiologie cardiaque et vasculaire. Et un grand merci pour son aide dans le cathétérisme gauche, et aussi pour tous les moments café qui permettent de tout repenser.

Je remercie le Dr Brakenhielm de nous avoir ouvert les perspectives de ce doctorat, avec sa grande connaissance de la physiologie du VEGF et de l'œdème cardiaque.

Merci aux gens du laboratoire Inserm U1096, titulaires et doctorants, pour leurs conseils, leur temps et leur disponibilité.

Merci aux étudiants en Master 2 ayant participé à ce projet. A Déborah pour avoir essuyé les difficultés du modèle LPS, à Hind, et Geoffrey pour son implication dans le modèle CLP et toutes les manip associées.

Merci à David Coquerel et Olivier Lesur pour la collaboration sur le modèle CLP-lactate.

Je remercie également tous les universitaires du département d'anesthésie-réanimation du CHU de Rouen (Pr Dureuil, Pr Compère, Pr Veber) qui m'ont soutenu, encouragé et m'ont donné les moyens de réaliser mes travaux universitaires avec une grande bienveillance. Je les remercie de m'avoir accueilli dans leur équipe pédagogique.

Merci à Thomas pour toutes nos longues discussions et le soutien inébranlable, dans les hauts et surtout les quelques bas. C'est nettement plus simple à deux.

Merci à tous mes proches, amis et collègues qui m'ont soutenu et encouragé dans l'élaboration de ce doctorat, sa réalisation et sa rédaction. A l'équipe d'anesthésie-réanimation cardiaque pour leur compréhension face à mon fréquent manque de disponibilité et leur soutien : Nat, Véro, Babeth, Scheche, Josy, Etienne. A Samia pour son aide sur la balance hydrique en réanimation cardiaque.

Un grand merci à ma famille, Alice, Nel, Maud (et bientôt A....) sans qui rien ne compterait vraiment. Merci pour leur amour et leur soutien indéfectible.

## Table des matières

<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1. <b>Sepsis : Histoire d'une pathologie complexe</b> .....	<b>1</b>
1.2. <b>Définitions du sepsis</b> .....	<b>2</b>
1.3. <b>Epidémiologie</b> .....	<b>3</b>
1.4. <b>Immunité et sepsis</b> .....	<b>4</b>
1.4.1. <b>Relation hôte-pathogène</b> .....	<b>4</b>
1.4.2. <b>Réaction pro-inflammatoire</b> .....	<b>5</b>
1.4.3. <b>Réaction anti-inflammatoire</b> .....	<b>7</b>
1.5. <b>Dysfonction endothéliale au cours du sepsis</b> .....	<b>9</b>
1.5.1. <b>Physiologie de l'endothélium</b> .....	<b>9</b>
1.5.1.1. <b>De la cellule endothéliale à l'endothélium</b> .....	<b>9</b>
1.5.1.2. <b>Le glycocalyx : élément clé de la fonction endothéliale</b> .....	<b>10</b>
1.5.2. <b>Grandes fonctions de l'endothélium et modulation liée au sepsis</b> .....	<b>12</b>
1.5.2.1. <b>Endothélium, hémostase et sepsis</b> .....	<b>12</b>
1.5.2.2. <b>Monoxyde d'azote dans le sepsis</b> .....	<b>13</b>
1.5.2.2.1. <b>Métabolisme du monoxyde d'azote</b> .....	<b>13</b>
1.5.2.2.2. <b>Place du NO dans la vasomotricité</b> .....	<b>15</b>
1.5.2.2.3. <b>Autres effets du NO au cours du sepsis</b> .....	<b>17</b>
1.5.2.2.3.1. <b>Effets cardiaques</b> .....	<b>17</b>
1.5.2.2.3.2. <b>Effets immunologiques</b> .....	<b>18</b>
1.5.2.2.3.3. <b>Autres défaillances d'organes</b> .....	<b>19</b>
1.5.2.3. <b>Recrutement et migration leucocytaire</b> .....	<b>19</b>
1.5.2.3.1. <b>Adhésion, rolling et arrêt</b> .....	<b>20</b>
1.5.2.3.2. <b>Diapédèse</b> .....	<b>21</b>
1.5.2.4. <b>Place de l'endothélium dans la perméabilité capillaire</b> .....	<b>22</b>
1.6. <b>Fuite capillaire au cours du sepsis</b> .....	<b>23</b>
1.6.1. <b>Mécanismes de l'hyperperméabilité capillaire au cours du sepsis</b> .....	<b>23</b>
1.6.1.1. <b>Jonctions serrées et adhérentes</b> .....	<b>23</b>
1.6.1.2. <b>Modulation de la barrière endothéliale au cours de l'inflammation</b> .....	<b>26</b>
1.6.1.3. <b>Système Angiotensinogène dans le sepsis</b> .....	<b>27</b>
1.6.1.4. <b>Signalisation VEGF au cours du sepsis</b> .....	<b>29</b>
1.6.1.4.1. <b>VEGF et VEGF-R</b> .....	<b>29</b>
1.6.1.4.2. <b>VEGF et perméabilité vasculaire</b> .....	<b>30</b>

1.6.1.4.3.	<i>VEGF en pathologie.....</i>	<b>31</b>
1.6.2.	<i>Approche clinique de la fuite capillaire.....</i>	<b>33</b>
1.6.3.	<i>Patients critiques et balance hydrique.....</i>	<b>35</b>
1.7.	<i>Place des solutés d'expansion volémique dans la fuite capillaire septique .....</i>	<b>37</b>
1.7.1.	<i>Volume et compartiment hydrique.....</i>	<b>37</b>
1.7.2.	<i>Équilibre acide-base : de la théorie à la pratique .....</i>	<b>38</b>
1.7.3.	<i>Les cristalloïdes.....</i>	<b>40</b>
1.7.3.1.	<i>Serum salé à 0,9% .....</i>	<b>41</b>
1.7.3.2.	<i>Cristalloïdes balancés.....</i>	<b>41</b>
1.7.3.2.1.	<i>Ringer lactate .....</i>	<b>42</b>
1.7.3.2.2.	<i>Malate acétate et gluconate acétate.....</i>	<b>42</b>
1.7.3.2.3.	<i>Impact clinique des solutés balancés .....</i>	<b>42</b>
1.7.3.2.3.1.	<i>Impact sur la fonction rénale .....</i>	<b>42</b>
1.7.3.2.3.2.	<i>Impact sur l'équilibre acido-basique .....</i>	<b>43</b>
1.7.3.2.3.3.	<i>Impact sur la coagulation .....</i>	<b>44</b>
1.7.3.2.3.4.	<i>Impact sur le processus inflammatoire.....</i>	<b>44</b>
1.7.4.	<i>Les colloïdes.....</i>	<b>45</b>
1.7.5.	<i>Soluté de lactate de sodium molaire .....</i>	<b>46</b>
1.7.5.1.	<i>Métabolisme du lactate .....</i>	<b>46</b>
1.7.5.2.	<i>Cœur et lactate .....</i>	<b>49</b>
1.7.5.3.	<i>Lactate et cerveau.....</i>	<b>50</b>
1.7.5.4.	<i>Lactate et l'inflammation .....</i>	<b>50</b>
2.	<i>Objectifs des travaux de recherche .....</i>	<b>54</b>
3.	<i>Résultats.....</i>	<b>55</b>
3.1.	<i>Partie 1 : effets de la balance hydrique au cours du choc cardiogénique réfractaire traité par ECMO veino-artérielle.....</i>	<b>55</b>
3.2.	<i>Partie 2 : intérêt du bevacizumab, anti-corps anti-VEGF, dans le sepsis.....</i>	<b>57</b>
3.3.	<i>Partie 3 : impact d'un soluté de lactate de sodium molaire sur la microcirculation, la fuite capillaire et la fonction cardiaque dans un modèle murin de sepsis .....</i>	<b>61</b>
4.	<i>Synthèse générale et perspectives .....</i>	<b>98</b>
4.1.	<i>Balance hydrique au cours du choc non septique.....</i>	<b>98</b>
4.2.	<i>VEGF et sepsis .....</i>	<b>99</b>
4.3.	<i>Impact d'un soluté de lactate de sodium molaire sur la microcirculation, la fuite capillaire et la fonction cardiaque.....</i>	<b>100</b>
5.	<i>Conclusion.....</i>	<b>101</b>

<b>6. Abbreviations.....</b>	<b>103</b>
<b>7. References .....</b>	<b>106</b>
<b>8. Curriculum Vitae et autres publications .....</b>	<b>121</b>

## 1. Introduction

### 1.1. Sepsis : Histoire d'une pathologie complexe

Le sepsis est actuellement défini comme la réaction anormale et dérégulée de l'organisme face à une infection, sous-tendant un certain nombre de processus pathologiques contre l'agent pathogène. Cependant, si le mot sepsis voit son origine dans l'Antiquité, sa définition en tant qu'entité nosologique a évolué au cours des siècles. Sa reconnaissance en tant que processus pathologique remonte aux premiers temps de l'Histoire de la médecine. Des papyrus de l'Égypte ancienne décrivaient déjà l'infection comme un processus pathologique associé aux plaies, et pouvant être potentiellement mortelle. Ainsi dans des papyrus estimés à 3600 ans avant J.-C., de nombreux cas de plaies compliquées et infectées étaient décrits, et notamment le cas était considéré comme incurable dès lors que des signes généraux s'ajoutaient à la présentation initiale<sup>1</sup>. Toujours dans l'Égypte Antique fut décrit ce qui pourrait être considéré comme la première description du sepsis, postulant qu'une substance dangereuse appelée « *ukhedu* » habitait dans nos intestins et pouvait migrer à travers les vaisseaux jusqu'à arrêter le cœur<sup>2</sup>. Au 5<sup>ème</sup> siècle avant J.-C., Hippocrate décrivit également les effets systémiques des infections : « Quand la coupure devient enflammée, les tissus avoisinants deviennent tumescents et la chaleur de la plaie se répand à travers les vaisseaux ». Il identifia également les voies de diffusion de l'infection avec le concept de lymphangite, qu'il intégrait dans sa théorie des « humeurs ». Dans sa description, le « *sepsis* » est la putréfaction des chairs, processus délétère, tandis que par opposition le « *pepsis* » vise à la digestion adaptée des infections. Par la suite, la description du processus infectieux s'enrichi progressivement au cours des siècles, avec par exemple la description de Celsus (45 avant J.-C. – 25 après J.-C.) : « *rubor et tumor cum calore et dolore* » décrivant ainsi pour la première fois l'entité nosologique de l'inflammation (*inflammationis*). La compréhension des processus pathologiques fut malheureusement freinée lors de la période médiévale avec l'avènement du caractère sacré, divin, du corps humain, interdisant *de facto* toute expérimentation. L'obscurantisme de cette période fut peu propice à la diffusion du savoir et le caractère purulent d'une plaie était encore largement reconnu comme bénéfique à la guérison, bien que cette notion erronée remonte au 2<sup>ème</sup> siècle avec les observations de Galen. Il faudra donc attendre les travaux de Semmelweiss, Pasteur et Koch au 19<sup>ème</sup> siècle pour relier le syndrome clinique infectieux à la présence de micro-organismes<sup>3</sup>. L'identification de l'agent causal ouvrait la porte à la compréhension des mécanismes provoquant la sévérité de l'infection. La suppuration n'était dès lors plus un processus participant à la cicatrisation mais la conséquence d'une prolifération de ces micro-organismes vivants. C'est au 20<sup>ème</sup> siècle que Schottmuller proposait la première définition moderne du sepsis, conséquence de l'envahissement constant ou périodique de la circulation sanguine à partir d'un foyer infectieux, et provoquant des symptômes généraux. Cependant, l'introduction de l'antibiothérapie moderne nuança la théorie purement microbienne du sepsis, puisque malgré l'éradication de l'infection, certains patients décédaient. Il s'avère donc que la sévérité du tableau est en grande partie due à la réaction de l'hôte à l'infection, aboutissant aux théories modernes du

sepsis<sup>4</sup>. Enfin, c'est en 1992 que la première définition scientifique du sepsis (SEPSIS-1) est proposée sous l'égide de l'*American College of Chest Physicians* et de la *Society of Critical Care Medicine*<sup>5</sup>. Le sepsis est alors défini comme la présence d'un foyer infectieux associé à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS.

## 1.2. Définitions du sepsis

Le SIRS correspond à une réaction inflammatoire systémique non spécifique. Il peut être la conséquence d'un sepsis tout comme d'une inflammation aseptique telle que le traumatisme sévère, la chirurgie majeure, la circulation extra-corporelle... Son diagnostic repose sur la présence d'au moins deux signes parmi<sup>5</sup>:

- Température corporelle  $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Fréquence cardiaque  $> 90$  battements par minute
- Fréquence respiratoire  $> 20$  par minute ou hyperventilation avec  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- Leucocytose  $> 12\,000 / \text{mm}^3$  ou  $< 4000 / \text{mm}^3$  ou  $> 10\%$  de formes immatures

Selon la première définition internationale du sepsis (SEPSIS-1), le sepsis était défini par l'association d'un SIRS et d'un foyer infectieux<sup>5</sup>. Rapidement sont apparues les limites d'une définition si imprécise, le SIRS étant hautement aspécifique, et le caractère infectieux souvent difficile à définir et de diagnostic parfois décalé dans le temps. Cette définition fut revue en 2001 sous la terminologie de SEPSIS-2. Le sepsis est alors toujours défini comme un SIRS en rapport avec une infection, mais des critères diagnostiques suggèrent une orientation vers une cause infectieuse, tels que la *C Reactive Protein*, la Procalcitonine, une défaillance d'organe, une hyperlactatémie  $> 1$  mmol/L et beaucoup d'autres...<sup>6</sup>. Bien que plus précise, mais également plus difficile à retenir et à appliquer, cette définition du SIRS restait médiocre quant à sa capacité à diagnostiquer une infection sévère avec une spécificité de seulement 27% chez des patients présentant une infection suspectée<sup>7</sup>. Ce manque de performance au diagnostic rendait nécessaire une nouvelle définition du sepsis, publiée en 2016<sup>8</sup>. **Le sepsis est dorénavant défini comme une dysfonction d'organe engageant le pronostic vital et causée par une dérégulation de la réponse de l'organisme à l'infection.** La dysfonction d'organe est alors identifiée par une augmentation du score de gravité SOFA (*Sequential Organ Failure Assesment*) d'au moins 2 points (tableau 1).

Score	0	1	2	3	4
Respiratoire PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	≥ 400	< 400	<300	<200	<100
Coagulation Plaquettes (G/mm <sup>3</sup> )	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie Bilirubine (μmol/l)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
Cardiovasculaire Hypotension artérielle	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamine < 5 μg/kg/min ou Dobutamine	Dopamine 5-15 ou Noradrénaline ≤ 0,1 μg/kg/min	Dopamine > 15 ou Noradrénaline > 0,1 μg/kg/min
Neurologique Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rein Créatinine (μmol/l) Ou Diurèse	< 110	110-170	171-299	300-440 Et/ou < 500 ml/jr	> 440 Et/ou < 200 ml/jr

Tableau 1 : score SOFA de sévérité d'après Ferreira *et al* JAMA 2001<sup>9</sup>

La performance du score SOFA à prédire la mortalité chez des patients suspects d'infection est nettement supérieure aux critères de SIRS, avec une spécificité de 70% et une sensibilité de 79%<sup>7</sup>. Le choc septique, évolution ultime et gravissime du sepsis, est quant à lui défini par :

- présence d'un sepsis (infection + augmentation score SOFA ≥ 2)
- hyperlactatémie > 2 mmol/L
- nécessité d'administration de vasopresseur afin de maintenir une Pression Artérielle Moyenne (PAM) d'au moins 65 mmHg, malgré la correction de toute hypovolémie.

Cette définition met en avant la diversité des présentations du sepsis et de ses formes graves, expliquant les faibles performances diagnostiques des définitions SEPSIS-1 et 2.

### 1.3. Epidémiologie

Par sa gravité et son incidence, le sepsis constitue un enjeu majeur de santé publique. Son incidence est estimée aux Etats-Unis entre 300 et 1000 cas/100 000 habitants/an, avec une tendance progressive à l'augmentation du nombre cas au cours du temps. La mortalité toutes causes confondues des patients

hospitalisés pour sepsis est quant à elle estimée entre 15 et 30% des cas selon les études et les définitions retenues du sepsis<sup>10</sup>, mais malheureusement elle dépend fortement des moyens alloués et de l'expérience de l'équipe, pouvant atteindre 50% dans certains cas<sup>11</sup>. Ainsi, les patients présentant un sepsis représentent 30% de la population admise en réanimation<sup>12</sup> avec des patients nécessitant une durée d'hospitalisation souvent prolongée, des traitements onéreux et une haute technicité des soins, aboutissant à un coût élevé de séjour, estimé à plus de 30 000\$ par patients<sup>13</sup>. L'extrapolation des données obtenues à partir des études épidémiologiques des pays développés permettait d'estimer que le sepsis affectait plus de 30 millions de personnes dans le monde et était responsable de plus de 6 millions de morts par an<sup>14</sup>. Néanmoins, les données épidémiologiques des pays à bas revenus sont peu ou pas accessibles, et il est probable que l'incidence et la mortalité réelle soient bien plus élevées devant la difficulté d'accès aux soins dans certains pays. Devant ce problème d'ampleur internationale, l'Organisation Mondiale de la Santé reconnaissait en assemblée du 26 Mai 2017 le sepsis comme une priorité de santé publique, énonçant par la même occasion l'importance de « promouvoir la recherche ciblant des moyens innovants dans le diagnostic et le traitement du sepsis, incluant la recherche [...] de technologies, interventions et traitements »<sup>15</sup>. En effet, malgré l'existence d'un arsenal anti-microbien, notamment antibiotique, large et souvent adapté aux agents pathogènes, la mortalité des états septiques n'a que peu diminué au cours des dernières décennies<sup>10</sup>. L'avènement de nouvelles thérapies innovantes est donc indispensable et doit probablement cibler les mécanismes de dérégulation de la réponse de l'hôte au pathogène, puisque la seule éradication de ce pathogène n'est pas toujours suffisante à enrayer la maladie.

## 1.4. Immunité et sepsis

### 1.4.1. Relation hôte-pathogène

Le sepsis est initié par la reconnaissance de l'agent pathogène et de signaux endogènes associés par un système de défense impliquant le système du complément, des récepteurs cellulaires spécifiques présents à la surface de certains types cellulaires immunitaires, mais également les cellules endothéliales et épithéliales, permettant à l'organisme de réaliser une veille vis à vis de l'infection. La reconnaissance d'un agent pathogène est en effet indispensable afin de débiter la réaction immunitaire permettant son éradication. La cascade physiologique de réaction débute par l'activation de certains récepteurs, les *pattern recognition receptors* (PRR) appartenant à plusieurs grandes classes : les *toll-like receptors* (TLR), les *mannose-binding lectin receptors*, les *retinoic acid-inductible gene (RIG)-like receptors*, les *scavenger receptors* et les *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*, ces derniers entrant dans la constitution du groupement protéique de l'inflammasome, élément majeur de la régulation de l'inflammation<sup>16</sup>. Cette liste n'est pas exhaustive et il est probable que d'autres types de récepteurs s'ajouteront à cette liste au fur et à mesure des investigations scientifiques, tant le processus de reconnaissance est complexe et de découverte récente.

L'activation de ces PRR peut être secondaire à la reconnaissance de molécules du pathogène, les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) qui sont des structures conservées au sein des agents microbiens, ou de molécules endogènes issues de la destruction tissulaire par le pathogène, les *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) ou « alarmines », constituant ce qui est appelé les « signaux de dangers »<sup>16-18</sup>. Les PAMPs sont essentiellement des sucres complexes, lipoprotéines ou acides nucléiques exprimés par les bactéries, virus ou champignons, comme le lipopolysaccharide (LPS) bactérien présent à la surface des bacilles à gram négatif (reconnu essentiellement par les TLR-4), les peptidoglycanes bactériens (TLR-2) ou les ARN double-brin viraux (TLR-3) pour ne citer qu'eux. Parallèlement, ces mêmes PPR sont capables de détecter des DAMPs, tels que les protéines *Extracellular Cold-Inductible RNA-Binding* (eCIRB), *High Mobility Group Box 1* (HMGB-1) mais également les histones provenant de la dégradation de l'ADN nucléaire ou mitochondriale ou même l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP)<sup>18</sup>. Le relargage cellulaire de ces DAMPs n'est pas spécifique de l'infection et peut s'observer dans tous les cas de destructions cellulaires importantes, expliquant le syndrome inflammatoire observé lors de polytraumatismes, chocs cardiogéniques, chirurgies majeures (...) et les possibles difficultés à parfois diagnostiquer l'origine septique ou non du processus inflammatoire.

#### 1.4.2. Réaction pro-inflammatoire

L'activation des PRR conduit à de complexes voies de transduction intracellulaire aboutissant à la production de médiateurs de l'inflammation. Cette signalisation implique notamment des voies phosphorylatives tels que les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *janus kinases* (JAKs) ou *myeloid differentiation primary response protein 88* (MYD88), avec *in fine* l'activation de facteurs de transcription génique tels que le *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), l'*activator protein-1* (AP1) [...] ayant pour objet l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation (figure 1).

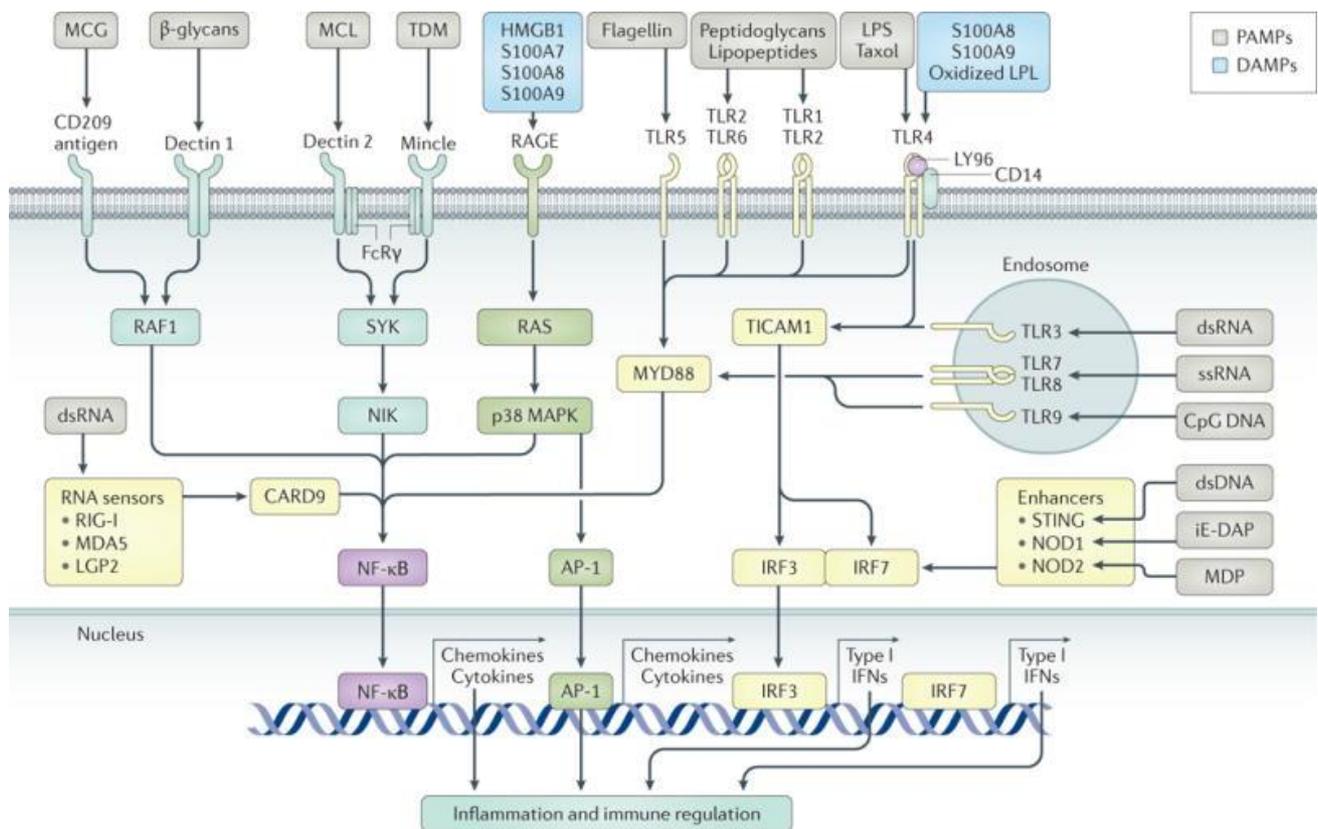


Figure 1 : Exemples d'interaction entre les *Pattern Recognition Receptors* (PRR) et les *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) et les *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) au cours du sepsis, et leurs voies de transduction cellulaire aboutissant à l'expression génique de facteurs pro-inflammatoires. D'après Hotchkiss *et al* Nat Rev Dis Primers 2017.

L'activation du facteur NF-κB, grâce à l'inactivation de son inhibiteur I-κB, entraîne sa dimérisation et sa translocation nucléaire, permettant l'expression de nombreux gènes indispensables à la réaction inflammatoire : cytokines, chémokines, interférons... D'autres facteurs sont également impliqués selon les voies de transduction PRR-PAMPs/DAMPs, comme l'AP-1 ou les *Interferon Regulatory Factor* (IRF)<sup>19</sup>. Ceci permet la production par les cellules immunitaires au site de l'infection (macrophages, fibroblastes) de cytokines pro-inflammatoires puissantes à la phase initiale de l'inflammation, principalement les Interleukines (IL) 1β, IL-12, IL-18, le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α pour ne citer qu'eux. Cette première phase survient dans les minutes suivant la pénétration de l'agent pathogène et va permettre l'amplification de la réponse inflammatoire, notamment grâce à la production par les cellules immunitaires locales d'autres cytokines : IL-3, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, IFNγ... mais également des facteurs chémotactiques permettant le recrutement cellulaire immunitaire au site de l'infection comme le *CC-chemokine Ligand 2* (CCL2), CCL3 et le *CXC-chemokine ligand 10* (CXCL10)<sup>17,20</sup>. Parmi ces cytokines l'IL-6 présente un rôle particulièrement important. Les taux plasmatiques d'IL-6 sont bien corrélés avec la sévérité de l'état septique, et notamment avec la

mortalité, avec des taux 1000 fois supérieurs à ceux de sujets sains, permettant de prédire l'apparition d'une dysfonction d'organe avec une spécificité de plus de 80%<sup>21</sup>. De plus, le taux d'IL-6 était également corrélé avec l'existence d'une dysfonction endothéliale (altération de la vasodilatation brachiale à l'ischémie) chez des patients diabétiques, témoin de ses multiples effets au sein de l'organisme<sup>22</sup>. Les effets de cette cytokine résultent de son interaction avec son récepteur spécifique IL-6R, lui-même couplé à la protéine transmembranaire gp130 responsable de la transduction intracellulaire<sup>23</sup>. Comme beaucoup de récepteurs aux cytokines, l'IL-6R n'est exprimé que dans un nombre limité de tissus, essentiellement les hépatocytes et les leucocytes, tandis que la gp130 est exprimée de façon ubiquitaire<sup>23,24</sup>. L'existence d'une forme soluble de l'IL-6R (sIL-6R) permet la transduction du signal inflammatoire dans une multitude d'autre type cellulaire, dont la cellule endothéliale<sup>25</sup>. Nous ne détaillerons pas ici l'ensemble des cytokines produites au cours du sepsis, mais cette liste non exhaustive illustre la complexité des processus impliqués dans la réaction inflammatoire locale secondaire à la pénétration du pathogène, véritable veille immunitaire contre l'infection. Nous n'aborderons pas non plus le détail des réactions immunitaires à l'infection, sortant du cadre strict de notre travail. Il est néanmoins important d'évoquer que cette réaction cytokinique locale va modifier l'expression des protéines à la surface des cellules endothéliales, avec une surexpression des protéines d'adhésion P et E-selectines, *InterCellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) et *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1). Les selectines permettent le ralentissement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales (*rolling*) tandis que VCAM-1 et ICAM-1 permettent l'adhésion ferme avec ces cellules grâce à l'interaction avec les protéines *Very Late Antigen 4* (VLA4) et *Leukocyte Function Antigen 1* (LFA1). Nous verrons plus en détails ces phénomènes dans le chapitre dédié à l'endothélium vasculaire.

La réaction pro-inflammatoire vise donc à stimuler localement la réponse inflammatoire à l'infection et s'avère donc bénéfique en limitant l'extension de celle-ci grâce à un effet anti-pathogène des cellules immunitaires recrutées et activées, mais également en diminuant le flux sanguin local par des phénomènes microvasculaires (hypercoagulation, vasoconstriction). Cependant, la production dérégulée, véritable « orage cytokinique », peut être dangereuse et induire des altérations des grandes fonctions physiologiques aboutissant à la défaillance multiviscérale. Ainsi il a été montré que l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire était corrélée avec la dysfonction d'organe et la mortalité de patients en choc septique<sup>26,27</sup>.

#### 1.4.3. Réaction anti-inflammatoire

Parallèlement à cette phase pro-inflammatoire se met en place une réaction anti-inflammatoire ayant pour objectif de contenir la production des cytokines pro-inflammatoires potentiellement dangereuses, et de participer secondairement à la phase de résolution de l'inflammation<sup>28</sup>. Cette phase anti-inflammatoire est également supportée par plusieurs cytokines dont IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, IL-35, *Transforming Growth Factor*β (TGF-β) ou les inhibiteurs spécifiques d'IL-1 (IL-1Ra) ou de TNF-α (*soluble TNF-α*)<sup>20</sup>. L'IL10 est une cytokine clé produite par les lymphocytes Th2 CD4+, les monocytes et les lymphocytes B. Elle inhibe la

production des cytokines pro-inflammatoires par les Lymphocytes Th1, macrophages, monocytes et neutrophiles<sup>29</sup>, permettant de réduire la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF... Elle permet également la production des inhibiteurs spécifiques IL-1Ra et sTNF- $\alpha$ , et favorise la production de cytokines anti-inflammatoires tels que l'IL-27<sup>30</sup>. Sa production est augmentée en réponse à l'activation des PRR de façon quasi concomitante aux premières phases de la réaction inflammatoire, mais son expression est également régulée par différents facteurs, et tout particulièrement la présence intracellulaire de glucocorticoïdes<sup>28</sup>. Si cette phase anti-inflammatoire a pour objectif la régulation de la réponse pro-inflammatoire à la phase très précoce du sepsis, puis de participer à la phase de résolution de cette inflammation, les patients survivants au sepsis présentent souvent des profils immunitaires inadaptés à moyen terme, avec une immunosuppression persistant plusieurs semaines et pouvant faire le lit d'infections secondaires acquises ou tardives impactant sur le pronostic au long terme. On peut évoquer de façon plus concrète l'exemple d'un jeune patient présentant une méningococcémie au tableau initial très bruyant associant fièvre, tachycardie puis troubles de conscience avec état de choc. Le profil est alors hautement pro-inflammatoire avec une réaction systémique intense. Dans un second temps, la phase pro-inflammatoire se résout, mais le patient présente un profil immunitaire déficitaire, permettant à des bactéries habituellement peu pathogènes d'infecter le sujet, qui développe alors une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique à germes opportunistes (par exemple à *Pseudomonas Aeruginosa*)<sup>31</sup>. Cette évolution biphasique est représentée sur la figure 2 d'après Hotchkiss *et al*<sup>32</sup>.

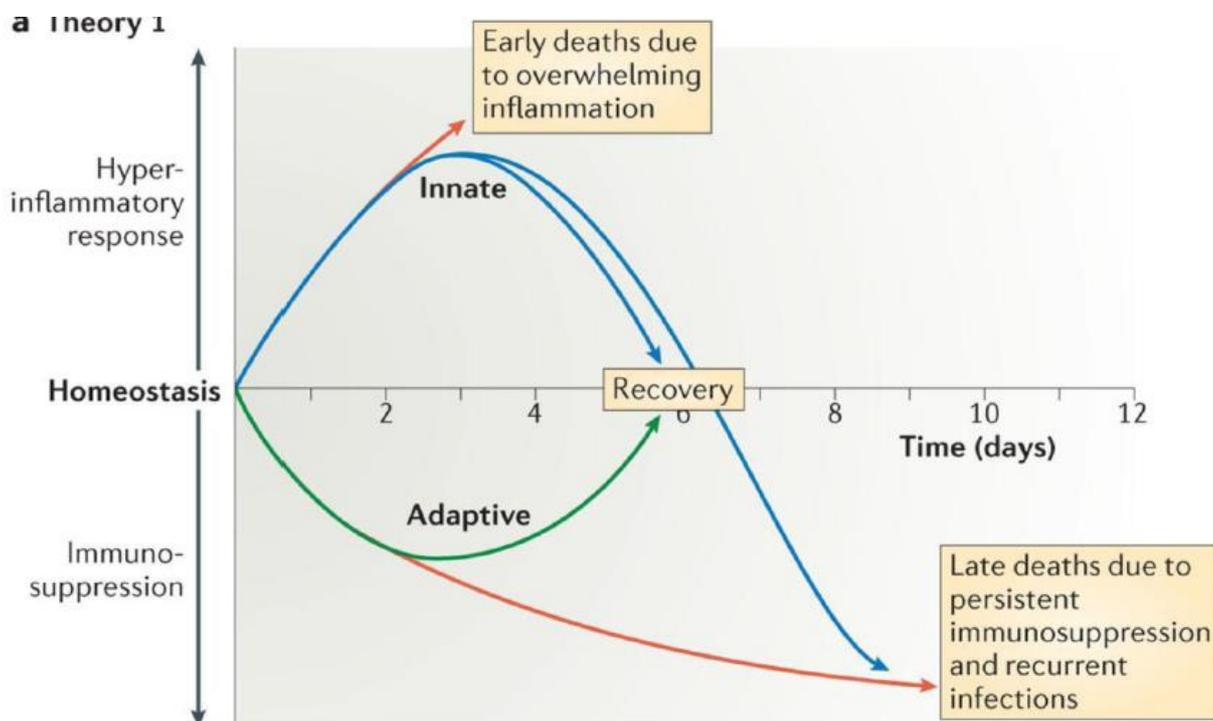


Figure 2 : Profil biphasique immunitaire avec réponse pro-inflammatoire initiale puis immunosuppression persistante. D'après Hotchkiss *et al* Nat Rev immunol 2013.

Ce déficit prolongé de l'immunité au décours du sepsis justifie les essais médicamenteux en cours , au stade expérimental ou clinique, visant à la stimuler par des thérapies telles que par GM-CSF, IFN $\gamma$  ou IL-7<sup>32-34</sup>.

Au total, l'organisme soumis à la pénétration d'un agent pathogène développe une réaction à la fois pro et anti-inflammatoire dont l'objectif initial est l'éviction du micro-organisme. Les *calor et rubor* observés sont donc bénéfiques à la lutte contre l'infection en favorisant l'afflux et l'activation du système immunitaire. Néanmoins dans les cas les plus graves les patients développent une réaction inflammatoire dérégulée conduisant à une atteinte systémique dangereuse et potentiellement mortelle : le sepsis. D'autres structures physiologiques primordiales peuvent être atteintes. C'est le cas de l'endothélium qui joue un rôle primordial à la fois dans l'immunité innée et dans la fonction des organes.

### 1.5. Dysfonction endothéliale au cours du sepsis

(Cette partie a fait l'objet d'une mise au point dans la revue *des anciens élèves de l'institut pasteur* en 2017, annexe 1)

L'endothélium est un élément majeur constituant l'arbre vasculaire. Sa position, en contact étroit avec le flux sanguin d'un côté et avec les autres couches vasculaires d'autre part, ainsi qu'un grand nombre de propriétés auto et paracrines, lui confèrent un rôle central dans l'homéostasie de nombreuses fonctions : vasomotricité, coagulation, afflux immunitaire, régulation des flux hydro-sodés pour ne citer qu'eux. Cependant, l'avènement d'une stimulation, tout particulièrement infectieuse, nécessite de la cellule endothéliale des ressources adaptatives qui peuvent outrepasser leur objectif, conduisant à la dysfonction endothéliale.

Au cours de cette partie nous détaillerons quelques généralités sur l'endothélium avant de détailler les grandes fonctions lui incombant et leur modulation par le sepsis.

#### 1.5.1. Physiologie de l'endothélium

##### 1.5.1.1. De la cellule endothéliale à l'endothélium

La cellule endothéliale est embryologiquement dérivée des angioblastes et hémangioblastes. Elle présente une forme longiligne permettant de minimiser les forces de cisaillement qui lui sont appliquées par le flux sanguin. Sa face apicale est orientée vers la lumière vasculaire, tandis que sa face basale est ancrée à une matrice extracellulaire riche en collagène : la lame basale. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions-intercellulaires, l'ensemble tapissant l'intégralité des vaisseaux sanguins et lymphatiques et constituant l'endothélium (Figure 4).

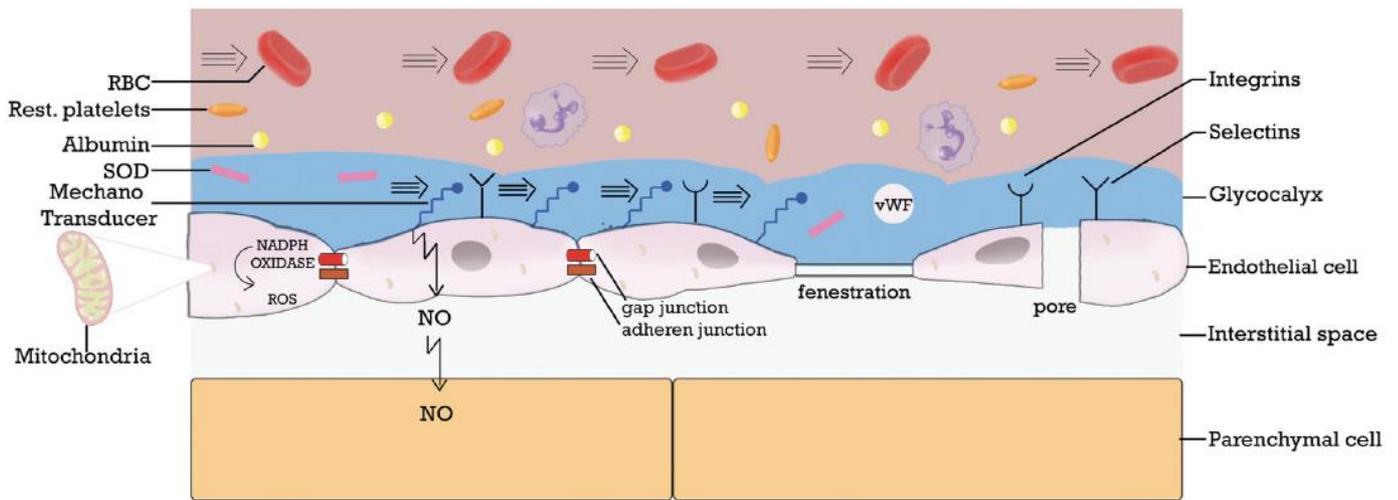


Figure 4 : représentation schématique de l'endothélium avec les jonctions intercellulaires, les fenestrations et les pores, illustrant l'endothélium comme zone d'interface et d'échange entre l'interstitium et le secteur vasculaire.

L'endothélium représente une surface globale comprise entre 300 et 1000 m<sup>2</sup>. La face endo-vasculaire est tapissée d'une fine couche, le glycocalyx, d'une épaisseur de 0,5 à 11 µm, composé en grande partie de glycosaminoglycannes jouant de nombreux rôles physiologiques, notamment en retenant de l'eau et des solutés, mais également en régulant le contact avec les éléments figurés du sang<sup>35</sup>. La morphologie comme la fonction de l'endothélium varient en fonction de l'organe et de la taille du vaisseau. Cette hétérogénéité est bien identifiée en microscopie électronique avec la présence par endroit de fenestrations. Ainsi on peut classer l'endothélium en « continu » (cerveau, poumons, cœur, peau, muscle), en « fenêtré » avec la présence de pores d'environ 50-60 nm de la surface apicale, fermés par un diaphragme (glandes endocrines, intestins, reins) et en « discontinu » avec des pores de 100 à 200 nm associés à une faible organisation de la lame basale (foie, rate, moelle osseuse)<sup>36</sup>. De plus, l'endothélium présente selon les endroits des variations de la composition du glycocalyx et des jonctions intercellulaires, renforçant son hétérogénéité. L'endothélium est un lieu privilégié d'échange et de régulation entre les secteurs vasculaires et tissulaires grâce à sa grande surface de contact, une porosité variable, mais également grâce à des éléments de régulation de l'hémostase, de la réponse immunitaire et de la vasoréactivité comme nous allons le voir par la suite.

#### 1.5.1.2. Le glycocalyx : élément clé de la fonction endothéliale

Le glycocalyx constitue une fine couche à la surface de l'endothélium participant activement à une très grande partie des fonctions exercées par l'endothélium. Son épaisseur est estimée à 0,5 à 11 µm et il représenterait environ 20% du volume intravasculaire<sup>37</sup>. Il est essentiellement composé de protéoglycannes, de glycoprotéines et de sialoprotéines ancrées à la cellule endothéliale par des glycosaminoglycannes<sup>38</sup>. Les protéoglycannes sont principalement le syndican, le glypican, le mimecan ou le biglycan, sur la face

endovasculaire desquelles se fixent des glycosaminocanes : heparane sulfate pour l'essentiel, mais également chondroïtine sulfate, kertane sulfate et dermatane sulfate<sup>39</sup>. Ces protéoglycanes ont un rôle majeur dans la physiologie vasculaire. Elles présentent un domaine transmembranaire et une portion C-terminale intracytoplasmique qui permettent la transmission des forces de cisaillement, générées par le flux sanguin, et la transduction du signal aboutit à l'*upregulation* de la eNOS et à la production de monoxyde d'azote (NO) aux propriétés vasodilatatrices (cf infra). De plus, leur taille excède celle d'autres glycoprotéines du glycocalyx, dont des molécules d'adhésion cellulaire telles que les intégrines ou les selectines, limitant de ce fait les interactions entre les leucocytes et la paroi vasculaire par effet de recouvrement. De même, les glycosaminoglycanes sont essentiellement sulfatés et donc porteuses de charges négatives repoussant à distance de l'endothélium les protéines chargées négativement, mais également les éléments figurés du sang et certains solutés chargés positivement. Ceci permet d'une part de maintenir un gradient oncotique, limitant la fuite capillaire, mais également de limiter les interactions entre les éléments figurés du sang et l'endothélium, régulant la transmigration et l'hémostase. Une autre fonction du glycocalyx est de maintenir certaines protéines à proximité de l'endothélium. C'est le cas pour l'antithrombine III qui exerce localement, avec l'aide des héparane-sulfates, un effet anticoagulant local. De même, la thrombomoduline et l'inhibiteur de la voie du facteur intrinsèque régulent la formation de thrombine puis d'un caillot<sup>39</sup>. Ainsi, le glycocalyx joue un rôle majeur dans les fonctions de perméabilité, d'hémostase, de régulation de l'immunité et de vaso-réactivité en symbiose avec l'endothélium.

Cependant, le processus inflammatoire observé au cours des processus septiques est à même d'endommager le glycocalyx. Les principaux facteurs pouvant le dégrader sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*), tels que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les anions hydroxyle OH<sup>-</sup> et superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mais également certaines protéases (héparanase et autres *shedases*), relargués notamment par les granulocytes et mastocytes activés lors des phénomènes infectieux ou d'ischémie-reperfusion, responsables d'un véritable décapage du glycocalyx<sup>40,41</sup>. L'activation directe de la cellule endothéliale pourrait également induire une dégradation de ce glycocalyx, notamment sous l'impulsion du LPS bactérien ou de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , induisant la production de protéase endothéliale intracellulaire avec détachement des protéoglycanes<sup>42</sup>. Il en résulte une diminution de l'épaisseur du glycocalyx chez les patients inflammatoires (sepsis, polytraumatisme, chirurgie majeure) comme récemment démontré *in vivo* par des techniques d'imagerie par microscopie sublinguale *Sidestream Dark Field Imaging* (Glycochek<sup>TM</sup>, Microvascular Health Solution, USA)<sup>43</sup>, ou comme également attesté par l'augmentation des taux circulants des composants du glycocalyx Syndecan-1 ou Heparane-Sulfate<sup>44-46</sup>.

## 1.5.2. Grandes fonctions de l'endothélium et modulation liée au sepsis

### 1.5.2.1. Endothélium, hémostasie et sepsis

L'hémostasie est un processus physiologique complexe faisant intervenir l'endothélium, les plaquettes, les globules rouges, les leucocytes et de nombreux facteurs plasmatiques. A l'état physiologique l'endothélium synthétise nombre de ces facteurs : facteur Von Willebrandt (vWf), facteur tissulaire (FT), inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), monoxyde d'azote (NO), prostacyclines, métabolisation de l'ATP et de l'ADP, thrombomoduline<sup>35,37</sup>. Le glycocalyx est également synthétisé par l'endothélium et joue un rôle dans l'hémostasie grâce à de nombreuses glycosaminoglycanes *heparin-like* et à la présence d'antithrombine. Ainsi l'endothélium produit à la fois des facteurs pro-coagulants et anti-coagulants, le mettant au centre de la régulation du processus d'hémostasie. En cas de brèche vasculaire, l'exposition de la matrice extracellulaire de la lame basale, et notamment du collagène, induit le recrutement plaquettaire grâce à l'interaction entre les récepteurs aux intégrines avec la laminine et la fibronectine associées à la matrice extracellulaire. Cette adhésion est renforcée par la cellule endothéliale grâce au relargage du vWf contenu dans les corps de Weibel-Palade endothéliaux<sup>47</sup>. Le vWf permet la liaison entre le collagène, contenu dans la matrice extracellulaire sous endothéliale, et le récepteur GPIb/IX/V plaquettaire. Ce processus est renforcé par la production endothéliale de facteur tissulaire activant la cascade de la coagulation *via* l'activation du facteur VII. A l'inverse, la production endothéliale de plusieurs facteurs limite la formation du caillot, tels que l'inhibiteur de voie du facteur tissulaire (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* TFPI) limitant la formation locale de fibrine, ou l'activation de la protéine C qui inhibe les facteurs V, VIII et le PAI-1<sup>37</sup>.

Cette régulation hémostatique peut être fortement altérée au cours des processus inflammatoires, et *a fortiori* au cours du sepsis. De nombreux facteurs systémiques sont à même d'altérer le fonctionnement normal de l'endothélium, et notamment du vWf. En effet la production de vWf nécessite le clivage protéolytique par la protéase ADAMTS-13 de méga-multimères vWf, extrêmement thrombotiques, en multimères de plus petites tailles et de pouvoir agrégant moindre. Ainsi les cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, IL-1 ou TNF- $\alpha$ , mais également des toxines bactériennes ou des autoanticorps neutralisants sont susceptibles d'inactiver l'ADAMTS-13<sup>37,48-50</sup>. La présence de taux anormaux de mega-vWf augmentant ainsi l'état prothrombotique des états septiques. Parallèlement, l'activation de la cellule endothéliale en présence de divers stimuli (endotoxine, cytokine, hypoxémie, espèces réactives de l'oxygène...) favorise la cascade de la coagulation en induisant une *upregulation* du facteur tissulaire, et donc favorise la formation de fibrine indispensable au caillot<sup>51</sup>. Cet état pro-coagulant est aggravé par la diminution de production ou l'inactivation du TFPI et de la protéine C. De plus, la cellule endothéliale activée par le sepsis surexprime de nombreux récepteurs d'adhésion leucocytaire et plaquettaire (ICAM-1, VCAM-1, selectines), soit par augmentation de leur production suite au stimulus inflammatoire, soit par dégradation du glycocalyx et augmentation de leur exposition au flux sanguin. L'augmentation de ces interactions entre les éléments figurés du sang et l'endothélium diminue le flux sanguin

local, favorisant ainsi la formation du caillot<sup>37</sup>. Enfin, l'activation du système du complément joue un rôle dans l'état d'hypercoagulabilité du sepsis par la création d'un complexe d'attaque, normalement destiné aux pathogènes, à travers la membrane endothéliale, exposant le facteur tissulaire<sup>48</sup>.

Au cours de l'infection, cette formation du caillot plaquettaire *via* l'activation endothéliale pourrait avoir des effets bénéfiques en permettant de circonscrire l'infection et en favorisant l'afflux des cellules immunitaires. Cependant, l'activation massive et inappropriée, comme observée dans les états les plus sévères, peut favoriser l'apparition d'une coagulation intra-vasculaire disséminée dans 25 à 50% des cas, hautement associée à la mortalité<sup>48,52</sup>. Les diverses monothérapies visant à prévenir l'altération de la coagulation lors du sepsis se sont toutes soldées à ce jour par des échecs : protéine C activée, antithrombine III, thrombomoduline..., témoin de la complexité de ce système et probablement de la nécessité de disposer de moyens diagnostiques des perturbations précises de l'hémostase, afin d'adapter la stratégie thérapeutique dans une optique de soins personnalisés au patient.

#### 1.5.2.2. Monoxyde d'azote dans le sepsis

(Cette partie a fait l'objet d'une mise au point dans la revue *Réanimation* en 2015, annexe 2)

##### 1.5.2.2.1. Métabolisme du monoxyde d'azote

De part sa proximité avec les couches musculaires lisses de la média et sa capacité à produire des médiateurs aux propriétés paracrines diffusant vers elles, la cellule endothéliale est indispensable au tonus vasculaire macro et microcirculatoire. Le NO est un élément gazeux radicalaire avec un fort pouvoir de diffusion découvert dans les années 1980<sup>53</sup>. Sa production est essentiellement assurée par l'endothélium où il est produit par les NO-synthases (NOS) à partir de la L-arginine. Sa forte diffusion à travers les couches lipidiques lui permet d'activer des cibles à plus d'une centaine de  $\mu\text{m}$  de son site de production. Bien que son site de production principal soit endothélial, il est également produit dans de nombreux types cellulaires : cellules immunitaires (leucocytes, macrophages, cellules dendritiques...), hépatocytes, cardiomyocytes, neurones, cellules musculaires striées... La production est assurée par 3 isoformes de NOS : la NOS endothéliale (eNOS), exprimée essentiellement dans l'endothélium et les cardiomyocytes<sup>54</sup> ; la NOS neuronale (nNOS) exprimée dans les neurones centraux et périphériques, mais également les cardiomyocytes, les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les cellules glomérulaires rénales et les cellules musculaires striées<sup>55,56</sup> ; la NOS inducible (iNOS) dont l'expression dans de nombreux tissus est induite par certains facteurs, notamment les cytokines pro-inflammatoires. Ces NOS permettent la production de NO et de citrulline à partir de la L-arginine, d'oxygène et de NADPH via un processus enzymatique impliquant un certain nombre de co-facteurs indispensables (tetrahydrobioptérine BH<sub>4</sub>, flavine-adenine dinucléotide FAD et flavine mononucléotide FMN, voir figure 5).

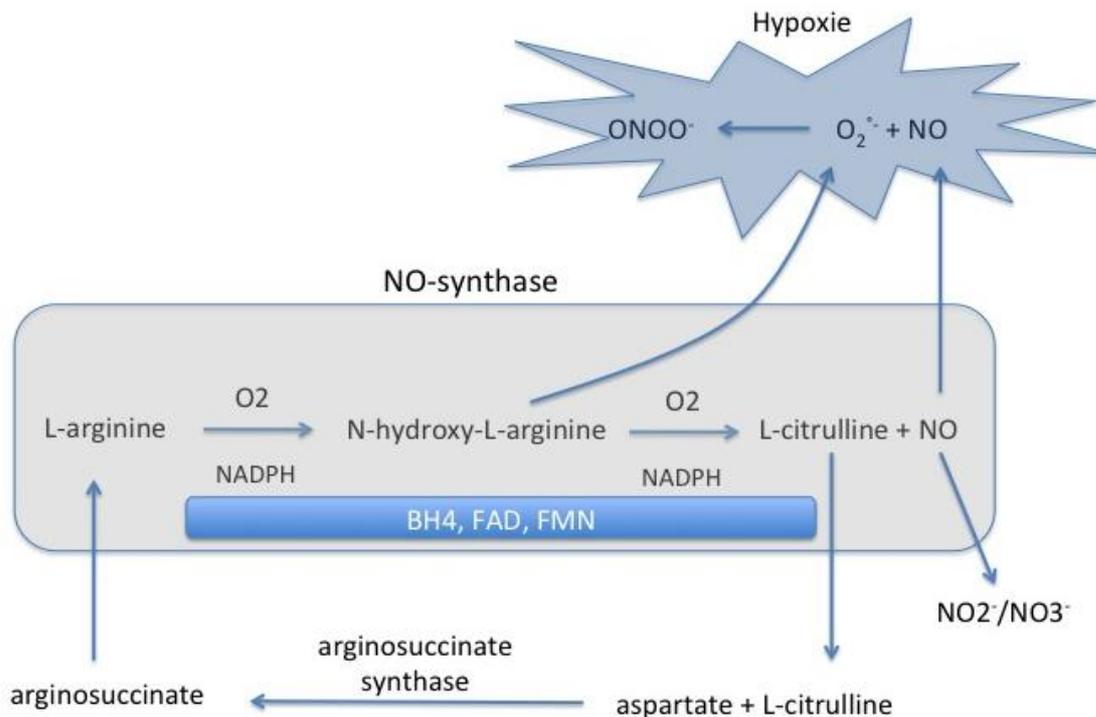


Figure 5 : représentation schématique du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et de ses principaux dérivés. La production de NO et de citrulline est assurée par des NO synthases à partir de L-arginine et nécessite plusieurs cofacteurs : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), tétrahydrobioptérine (BH4), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN). Dans certaines conditions, la citrulline peut être recyclée en L-arginine par l'arginosuccinate synthase (cycle arginine-citrulline). Le NO peut donner naissance au peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) par conjugaison avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ). Les nitrates ( $NO_2^-$ ) et nitrites ( $NO_3^-$ ) sont d'autres métabolites actifs du NO. D'après Besnier *et al*, Réanimation 2015.

Ces enzymes présentent deux sites catalytiques et un site réductase permettant le transfert d'électrons à partir du NADPH vers l'hème du site oxygénase qui entraîne la transformation en tant que telle de l'arginine en citrulline et NO.

La eNOS et la nNOS, dites constitutives, produisent à l'état physiologique du NO. Leur fonctionnement est modulé par la concentration intracellulaire de calcium<sup>53</sup>, tandis que la iNOS, dite inducible, est indépendante du calcium. Au cours du processus septique, l'exposition conjointe aux multiples cytokines permet l'induction de cette iNOS. Ainsi, l'exposition de macrophages murins au LPS et à l'INF- $\gamma$  induit une forte expression de la iNOS. De même, l'IL-1 induit une forte expression de cette enzyme au sein des chondrocytes et/ou des cellules pancréatiques. Enfin, l'exposition concomitante d'hépatocytes murins aux LPS, IL-1, TNF- $\alpha$  et INF- $\gamma$  provoque l'induction de cette NOS *via* le NF- $\kappa$ B avec production explosive de NO, près de 100 à 1000 fois plus importante que les taux produits par les NOS constitutives<sup>57-59</sup>. A contrario, l'expression de la iNOS semble être *down-régulée* par la présence des cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, l'IL-4, IL-8 et l'IL-10 diminuent l'expression de iNOS de macrophages murins et l'ajout de TGF- $\beta$  à des

cultures d'hépatocytes réduit l'expression de iNOS induite par les cytokines pro-inflammatoires<sup>57</sup>. L'utilisation de dexaméthasone diminue drastiquement l'expression de iNOS induite par les cytokines pro-inflammatoires dans les hépatocytes murins *in vitro*<sup>58</sup>. L'expression de la iNOS semble donc bien être conditionnée, au moins en partie, par le profil inflammatoire de l'organisme.

### 1.5.2.2.2. Place du NO dans la vasomotricité

Le NO est un agent indispensable à la régulation de la vaso-réactivité en conditions physiologiques. La production endothéliale par la eNOS est secondaire principalement à la détection de force de cisaillement pariétale ou « *shear stress* » ainsi qu'au caractère pulsatile de la pression artérielle<sup>60,61</sup>. Les mécanismes moléculaires permettant la détection de cette tension pariétale sont nombreux et feraient intervenir différentes voies de signalisation dont les intégrines, la modification du cytosquelette endothéliale, la perturbation du glycocalyx, la voie des tyrosines kinases<sup>62</sup>... Après production au sein de la cellule endothéliale, principalement par la eNOS et plus faiblement par la nNOS, le NO diffuse librement vers les couches musculaires de la média vasculaire où il active une guanylate cyclase soluble cytosolique permettant d'augmenter la production de GMPc<sup>63</sup>. Le GMPc est un second messager induisant une cascade de transduction intracellulaire impliquant de multiples kinases, responsables de la diminution du calcium cytosolique et limitant de ce fait la contraction de la cellule musculaire lisse<sup>64</sup>. L'effet vasodilatateur du NO résulte donc d'une diminution du tonus vasculaire intrinsèque (figure 6)

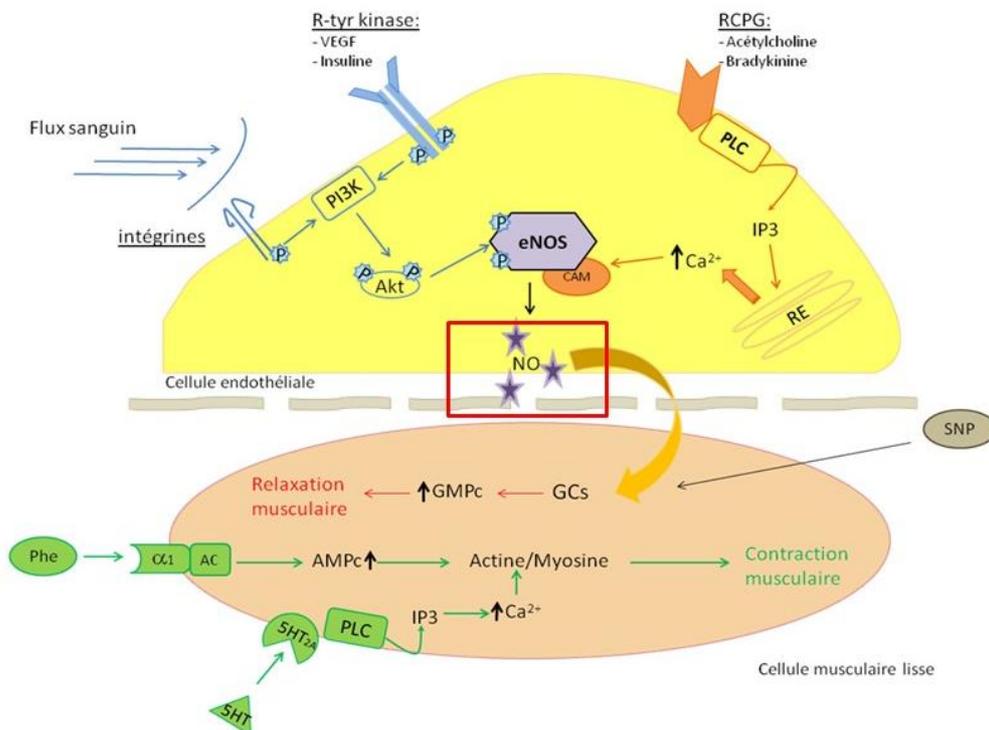


Figure 6 : place du monoxyde d'azote (NO) dans la vasomotricité. La production du NO a lieu dans la cellule endothéliale suite à l'activation des NO-synthases par différents signaux membranaire : *shear stress* du flux sanguin, activation de récepteurs tyrosine-kinases, récepteurs couplés aux protéines G... le NO diffuse ensuite par effet paracrine à la cellule musculaire lisse et induit l'augmentation du GMPcyclique et la relaxation musculaire.

Au cours des états septiques, il est actuellement suggérer que l'activation de la iNOS induirait une augmentation importante du NO plasmatique et serait impliquée dans la vasodilatation observée<sup>63</sup>. Dans un modèle murin de sepsis par ponction ligature caecale, l'abolition de l'activité iNOS (par invalidation génique ou inhibiteur pharmacologique) n'induisait que peu de différence quant à la pression artérielle mais une amélioration significative de la réponse à la noradrénaline<sup>65</sup>. Il semble donc que les voies du NO inductible aient un effet indirect sur l'hypotension artérielle du sepsis par la non-réponse aux catécholamines, qu'elles soient endogènes ou exogènes, plus que par un effet direct vasodilatateur. Des travaux récents menés dans un modèle murin de sepsis identifiaient également la nNOS comme facteur de non-réponse aux vasopresseurs. En effet, cette NOS était exprimée de façon importante dans les tissus vasculaires et corrélée aux taux de GMPC tandis que son inhibition restaurait la réponse aux amines vasopressives<sup>66</sup>. Ainsi, la nNOS semble avoir un rôle important dans la dysfonction vasculaire du choc septique. De plus, au cours du processus septique la métabolisation de la L-arginine par les NOS ne serait que partielle du fait d'un déficit de fonctionnement du site oxygénase, soit par des conditions d'hypoxies locales, soit par un déficit en co-facteur BH4, déviant alors la production vers la formation d'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) (figure 5). La combinaison avec le NO déjà présent aboutissant alors à la formation de peroxynitrite  $ONOO^-$  présentant lui-même une toxicité vasculaire pouvant aboutir à l'hypotension artérielle. Le  $ONOO^-$  aurait la capacité d'inactiver les catécholamines par oxydation au niveau de leur cycle aromatique, ou bien d'induire une inactivation des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques ainsi que ceux pour la dopamine ou l'hormone vasopressive<sup>67-69</sup>. Ainsi, le  $ONOO^-$  pourrait être en partie responsable de la vasoplégie observée au cours du sepsis. Dans un modèle *ex-vivo* d'aorte thoracique de rat, l'incubation en présence de  $ONOO^-$  entraînait une diminution de la réponse vasomotrice et une destruction de la noradrénaline tandis que l'utilisation de donneur de NO n'entraînait pas de modification du tonus vasculaire. D'après ces données, il semble qu'en situations critiques le NO présente au final peu d'impact direct sur le tonus de la macro-circulation tandis que le  $ONOO^-$  généré en situation d'hypoxie pourrait participer à la vasoplégie observée au cours du sepsis.

La micro-circulation est particulièrement atteinte au cours du choc septique et potentiellement responsable de multiples défaillances d'organes. Le NO est capable de diffuser au sein de la lumière vasculaire et d'agir sur les éléments circulants. Il peut ainsi moduler la déformabilité des érythrocytes et des leucocytes et est un acteur important de l'activité plaquettaire au cours du sepsis<sup>70</sup>. L'inactivation de la production de NO au cours d'un modèle endotoxinique provoque une augmentation de l'adhésion plaquettaire, témoin du rôle inhibiteur du NO sur cette fonction au sein de la micro-circulation<sup>71</sup>. Le  $ONOO^-$  augmenterait l'adhésion leucocytaire et plaquettaire au niveau des veinules post-capillaires et participerait à l'augmentation de la perméabilité capillaire au cours du sepsis par désorganisation des jonctions intercellulaires<sup>72,73</sup>. De plus, ce radical libre semblerait être un acteur important de la dysfonction de la media vasculaire micro-circulatoire et donc de l'hypoperfusion tissulaire. L'administration d' $ONOO^-$  altère la relaxation micro-vasculaire par des agents

vasodilatateurs observée *ex-vivo*<sup>74</sup> et a contrario la neutralisation de l' $O_2^{\circ-}$  protège contre cette dysfonction dans des modèles murins de choc septique<sup>75</sup>. Ainsi, le ONOO<sup>-</sup> pourrait participer à la dysfonction micro-circulatoire du sepsis en limitant les phénomènes de vasodilatation capillaires nécessaires au maintien de la perfusion d'organe. Dans un modèle de cœur isolé de rat, l'application de ONOO<sup>-</sup> induisait une dysfonction de la vaso-réactivité coronarienne avec absence de la vasodilatation normalement induite par l'acetyl-choline ou l'isoproterenol<sup>74</sup>. Les hypothèses pour cette dysfonction de la vaso-réactivité musculaire lisse sont multiples : diminution de l'ATP disponible par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale ou par activation de la PARP, nitration de l'actine F, activation directe de canaux potassiques, inactivation des pompes calciques du réticulum sarcoplasmique<sup>72</sup>. Par ailleurs, la déviation du métabolisme de l'arginine vers le ONOO<sup>-</sup> pourrait se solder par une carence en NO micro-vasculaire responsable d'une diminution du signal vasodilatateur exercé par ce radical.

Au total, les dérivés du NO produits lors des situations septiques induisent à la fois une vasoplégie d'ordre macrocirculatoire se traduisant par l'hypotension artérielle, et une inhibition des phénomènes adaptatifs d'ordre microcirculatoire, pouvant induire une hypoperfusion périphérique.

### 1.5.2.2.3. Autres effets du NO au cours du sepsis

#### 1.5.2.2.3.1. Effets cardiaques

Les cardiomyocytes et les neurones à destinée cardiaque sont pourvus des trois types de NOS. Alors que la eNOS est présente au niveau de la membrane cellulaire au sein d'invagination appelée « cavéoles », la nNOS est exprimée au niveau du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes<sup>76</sup>. Ces différences de localisation conditionnent en partie les sites de régulation de la fonction cardiaque. Ainsi, le NO produit par le eNOS inhibe l'activité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Le NO produit par la nNOS sarcoplasmique semble plutôt opérer un effet sur la régulation intracellulaire des flux calciques par inhibition de l'activation du récepteur à la ryanodine. Enfin, de façon commune à ces deux NOS, le NO active la protéine kinase G (*via* la voie du GMPC) induisant une phosphorylation de la troponine I (et donc une diminution des interactions troponine-calcium) et une altération des flux calciques transmembranaires par inactivation des canaux calciques de type L<sup>76,77</sup>. Ces effets semblent influencés par la concentration locale en NO puisque de faibles concentrations de NO semblent paradoxalement stimuler la protéine kinase A responsable d'un effet inotrope positif. En situation pathologique, la production de NO est explosive, notamment par le biais de l'induction de la iNOS cytosolique. Le NO produit induit les mêmes effets que précédemment mais de façon décuplée, associés à un stress radicalaire par production de ONOO<sup>-</sup>. En effet, l'invalidation du gène de la iNOS induisait une augmentation de la réponse aux catécholamines et du travail myocardique dans un modèle murin de sepsis<sup>65</sup>. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteur de NOS et de donneurs de NO a permis de mettre en évidence

un effet modulateur du NO sur la synthèse de noradrénaline par le système autonome cardiaque. La diminution du taux de NO neuronaux induisait une augmentation de la production de noradrénaline, témoin du tonus inhibiteur du NO sur le système autonome<sup>78</sup>. De plus, les cardiomyocytes sont particulièrement sensibles au ONOO<sup>-</sup> comme l'atteste l'inhibition de la contraction et la diminution de la fonction cardiaque systolique et diastolique dans un modèle inflammatoire de cœur isolé-perfusé de rat<sup>79</sup>.

#### 1.5.2.2.3.2. Effets immunologiques

Le NO présente également des effets sur les cellules du système immunitaire. Au cours du sepsis, les veinules post-capillaires sont le site d'une intense réaction inflammatoire avec infiltrat neutrophile et d'une augmentation de la perméabilité à l'eau et aux protéines, responsables d'une dysfonction de la micro-vascularisation potentiellement impliquée dans l'apparition des défaillances d'organes<sup>80</sup>. La réaction neutrophile se traduit par une augmentation des contacts entre l'endothélium et les leucocytes circulants. Le NO est un acteur primordial de ces interactions en inhibant l'adhésion neutrophile à l'endothélium<sup>81-83</sup>. Au cours du sepsis, l'infiltration neutrophile est majorée par le syndrome inflammatoire et le NO diminue leurs phénomènes d'adhésion et de migration tissulaire<sup>83-85</sup>. L'inhibition de la migration des neutrophiles pourrait être en relation avec une *down-regulation* du CXCR2, récepteur à une des principales chémokines synthétisées au cours du processus infectieux, par le NO produit par la iNOS<sup>86</sup>. Une autre voie pourrait être une nitrosylation par le NO du réseau d'actine des neutrophiles limitant la migration cellulaire via l'inhibition de l'activité de la  $\beta_2$ -intégrine<sup>87</sup>. Hickey et coll ont pu mettre en évidence, grâce à l'utilisation d'une chambre de flux *in vitro* exempte de cellules endothéliales, que les leucocytes produisaient de façon inductible le NO, limitant leur adhésion à la microcirculation<sup>88</sup>. Cependant, il semble exister dans la littérature des discordances quant à l'effet du NO sur l'infiltrat neutrophile inflammatoire. Certaines études montraient à l'inverse un effet pro migratoire du NO associé à une modulation de l'expression des protéines de surfaces. Très probablement le NO présente un effet dual en fonction de son niveau d'expression et du profil inflammatoire de l'organisme. Dans un modèle murin de sepsis, deux niveaux d'intensité inflammatoire furent analysés : un niveau léthal avec 100% de mortalité et un niveau sub-léthal avec une mortalité de 40% à 5 jours. Les souris du modèle léthal présentaient une diminution de l'adhésion et de la migration leucocytaire. Ce phénomène était réversible chez les souris déficientes pour la iNOS, reflet donc de l'effet anti-migratoire du NO inductible. Cette diminution de migration était associée à la diminution de l'expression de  $\beta_2$ -intégrines des neutrophiles, molécules impliquées dans les interactions endothélium-leucocytes. A contrario, les souris présentant un sepsis sub-léthal présentait une augmentation de l'activation migratrice des neutrophiles, suggérant un effet pro-migratoire du NO dans cette situation<sup>89</sup>. Les souris déficientes pour la iNOS dans le modèle sub-léthal présentaient une mortalité accrue. Ainsi, l'infiltration neutrophile pourrait être bénéfique à certains stades du sepsis, permettant la clairance bactérienne, notamment grâce aux effets bactéricides des dérivés du NO produits par ces cellules immunitaires. Concernant les mécanismes d'adhésion leucocytaire, les travaux de *Hickey et coll*, sur un

modèle inflammatoire au LPS (n'induisant ainsi qu'un nombre plus restreint de voies de l'inflammation) ne mettait pas en évidence d'effet de la iNOS sur l'expression des molécules impliquées dans l'adhésion leucocytaire que sont les E-selectines, P-selectine et VCAM-1<sup>83</sup> alors que des travaux réalisés au cours d'un sepsis polymicrobien objectivaient une augmentation des E et P selectines par la iNOS<sup>90</sup>. Il semble donc que le sepsis induise une augmentation des protéines d'adhésion leucocytaire *via* la production de NO grâce à des voies de signalisations complexes.

Ainsi, la production de NO au cours du sepsis est à la fois indispensable à une réaction adaptée contre le pathogène et délétère en cas de pérennisation du processus infectieux.

#### 1.5.2.2.3.3. Autres défaillances d'organes

A l'état physiologique l'activité NOS constitutive participe à un nombre important de fonctions pulmonaires comme la vasodilatation pulmonaire, la bronchodilatation et la modulation immunitaire locale<sup>91</sup>. Néanmoins le NO semble impliqué dans la pathogénie de l'altération pulmonaire de nombreux processus inflammatoires. Ainsi, la production du NO est augmentée au sein du liquide alvéolaire et du sang pulmonaire lors du sepsis<sup>92,93</sup>, et serait impliquée dans l'hyperperméabilité vasculaire pulmonaire observée au cours du Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu (SDRA)<sup>94,95</sup>. Le NO produit spécifiquement par les neutrophiles induirait une augmentation de l'infiltration inflammatoire pulmonaire, un stress oxydant et une augmentation de la perméabilité microvasculaire<sup>96</sup>. Parallèlement, le ONOO<sup>-</sup> inhibe les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP dépendantes dans les pneumocytes de type 2 et perturbe ainsi la formation du surfactant, pouvant participer à l'altération des échanges gazeux au cours du sepsis<sup>97</sup>.

Le NO semble pouvoir influencer également la fonction surrénalienne au cours du processus septique. Ainsi, dans des modèles LPS et de sepsis, l'utilisation de donneurs de NO diminuait la capacité de fixation du récepteur aux glucocorticoïdes tandis que l'inactivation du gène de la iNOS restaurait cette fonction<sup>98</sup>.

Le NO synthétisé au cours du sepsis présente également des effets néfastes sur le foie<sup>99</sup>, le rein<sup>100</sup> ou le tissu intestinal. Comme précédemment, le ONOO<sup>-</sup> aurait une place non négligeable dans la genèse de ces dysfonctions de par les nombreuses lésions intracellulaires qu'il peut induire. Il serait notamment à même de promouvoir la translocation bactérienne depuis le tissu intestinal par l'altération de la perméabilité tissulaire<sup>78</sup>.

#### 1.5.2.3. Recrutement et migration leucocytaire

La régulation de l'afflux de leucocytes au site de l'infection participe à la réponse immunitaire. Ce mécanisme d'extravasation cellulaire à travers la paroi vasculaire présente plusieurs étapes successives : l'adhésion, le *rolling* et l'arrêt à la surface endothéliale, puis enfin la diapédèse cellulaire à travers la paroi endothéliale (figure 7).

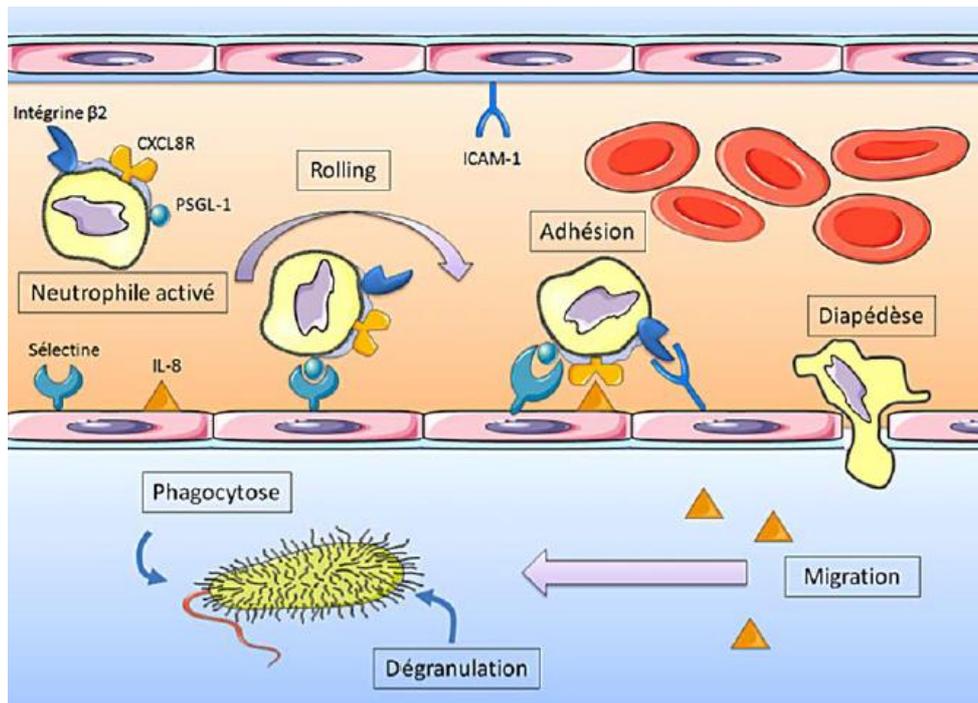


Figure 7 : représentation schématique des phénomènes de migration leucocytaire transendothéliale au site de l'infection. D'après Libert *et al* Ann Fr Anesth Réa 2010.

#### 1.5.2.3.1. Adhésion, rolling et arrêt

Les leucocytes circulants sont tout d'abord « freinés » grâce à l'expression de molécules d'adhésion à la surface endothéliale<sup>101</sup>. La famille des sélectines est au centre de ces phénomènes. Ces glycoprotéines transmembranaires sont principalement exprimées au niveau des veinules post-capillaires, où le flux sanguin est le plus faible et où la taille des vaisseaux favorisent le contact entre les éléments figurés du sang et la surface vasculaire. Trois types de sélectines sont actuellement identifiées : E, P et L. Elles sont contenues à l'état physiologique dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et la présence d'un stimulus inflammatoire conduit à l'augmentation de la production de ces molécules et à leur exocytose à la surface endothéliale. De plus, la destruction du glycocalyx par le stress inflammatoire, notamment *via* la production de *sheddase* (voir plus haut) facilite la reconnaissance de ces molécules par les leucocytes circulants. Ces sélectines se lient principalement à une glycoprotéine leucocytaire ligand, la PSGL-1 selon des liaisons de faible intensité, permettant le ralentissement puis le « roulement » des leucocytes à la surface endothéliale. Dans un second temps s'établit des liaisons de plus forte intensité. La production de chémokines tissulaires par le stress inflammatoire va en effet induire l'uprégulation d'intégrines leucocytaires de surface (essentiellement LFA-1, VLA-4 et Mac-1), qui vont interagir avec des glycoprotéines endothéliales : ICAM-1 et ICAM-2 exprimées à l'état physiologique et VCAM-1 exprimée suite à la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires<sup>101,102</sup>. Des taux circulants particulièrement élevés d'ICAM-1, de VCAM-1 et de sélectines E sont observés au cours des processus septiques et sont associés à la sévérité de l'état septique, à l'apparition d'une dysfonction d'organe et à la mortalité<sup>103</sup>.

#### 1.5.2.3.2. Diapédèse

Une fois arrêté le leucocyte va s'aplatir et se polariser afin de chercher une voie d'entrée à travers l'endothélium. Cette polarisation consiste en une polymérisation des filaments d'actine F en lamelopodes, en doigts de gant, selon le gradient de concentration des agents chémoattractifs<sup>104</sup>. De façon concomitante est observée une modification physico-chimique de la membrane cellulaire des neutrophiles avec concentration de microdomaines lipidiques riches en intégrines telles que LFA-1, Mac-1, CD11b [...] permettant de consolider la liaison à l'endothélium<sup>102,105-107</sup>. Au final, le leucocyte activé à la surface de l'endothélium présente une modification conformationnelle avec un aplatissement et la création de protusions invasives riches en actine et en intégrines, cherchant une « brèche » vasculaire<sup>108</sup>. Avant l'étape de diapédèse à proprement parler, la cellule endothéliale joue également un rôle actif dans l'« acceptation » du leucocyte, avec une modification également de sa membrane cellulaire formant des structures riches en molécules d'adhésion (ICAM-1) en forme de filopodes entourant le leucocyte, confortant la stabilisation à la surface endothéliale avant diapédèse<sup>102,109</sup>. Deux voies de migration à travers l'endothélium ont été mises en évidence : une voie paracellulaire et une voie transcellulaire. La voie paracellulaire fut la première décrite. A cette fin, de nouvelles liaisons vont s'établir entre les intégrines leucocytaires et les jonctions intercellulaires endothéliales, notamment avec les glycoprotéines PE-CAM 1, JAM, CD99 et ESAM particulièrement concentrées dans ces zones intercellulaires. Après l'adhésion ferme, l'interaction avec ICAM-1 et  $\beta$ 2-intégrines est responsable de la phosphorylation des VE-cadhérines, éléments indispensables de la jonction inter-cellulaire, et permettant la migration du leucocyte entre les cellules endothéliales, notamment grâce à des interactions séquentielles avec les protéines JAM et PE-CAM et à des vésicules spécialisées, les *endothelial lateral border recycling compartment* (LBRC), produites par l'endothélium, et riches en molécules d'adhésion libres, notamment PE-CAM, JAM et CD99, permettant de « guider » les leucocytes à travers cet espace<sup>102,110-113</sup>. La voie transcellulaire permet quant à elle le passage du leucocyte à travers la cellule endothéliale par la création d'un canal transcellulaire, tout en laissant la cellule intacte. Les mêmes acteurs d'adhésion sont indispensables à la migration : ICAM-1, PE-CAM-1, CD99, JAM [...]. La migration à travers la cellule repose également sur l'utilisation de vésicules spécialisées apportant les éléments nécessaires : cytosquelette, molécules d'adhésion, membrane cellulaire... formant un véritable « tapis roulant » pour le leucocyte<sup>102,108,114,115</sup>. On suppose actuellement qu'environ 15% des migrations sont réalisées par voie transcellulaire, néanmoins cette proportion est variable selon le tissu et la situation physiopathologique. Ainsi le phénomène transcellulaire est fréquent à l'état physiologique au niveau cérébral, probablement en raison du caractère spécialisé et très serré des jonctions intercellulaires<sup>116</sup>, tandis que la voie paracellulaire peut augmenter en cas de stress inflammatoire responsable d'un relâchement des jonctions cellulaires (cf infra). Une fois la couche endothéliale dépassée, la dernière étape correspond au franchissement

des péricytes vasculaires selon des mécanismes encore mal étudiés, mais faisant probablement intervenir des interactions entre intégrines leucocytaires et collagène.

Au total, lors du sepsis la production de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines va induire à la fois une activation de la cellule endothéliale, favorisant l'expression de glycoprotéines d'adhésion, elles-même d'accès facilité par la destruction du glycocalyx protecteur, mais également une activation des leucocytes circulants avec expression membranaire d'intégrines, favorisant les étapes d'adhésion et d'arrêt. Puis la présence des chémokines inflammatoires va permettre la modification de conformation nécessaire à la diapédèse, soit par voie paracellulaire favorisée par la perte d'adhésion intercellulaire, soit par voie transcellulaire.

#### 1.5.2.4. Place de l'endothélium dans la perméabilité capillaire

La diffusion de l'eau et de certaines petites molécules depuis la lumière vasculaire vers le secteur interstitiel s'effectue à travers l'endothélium majoritairement au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires. Ce mouvement est classiquement régi par la loi de Starling pour les membranes biologiques semi-perméables : le transfert s'effectue selon un gradient de pression hydrostatique, contrebalancé par un gradient inverse de pression oncotique selon un équilibre des forces tel que  $J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma[\pi_c - \pi_i])$ , où  $J_v$  est le débit net de fluides,  $K_f$  le coefficient de filtration dépendant de la membrane (et notamment de la présence de fenestration),  $P$  la pression hydrostatique,  $\pi$  la pression oncotique et  $\sigma$  le coefficient de réflexion oncotique<sup>117</sup> (figure 8).

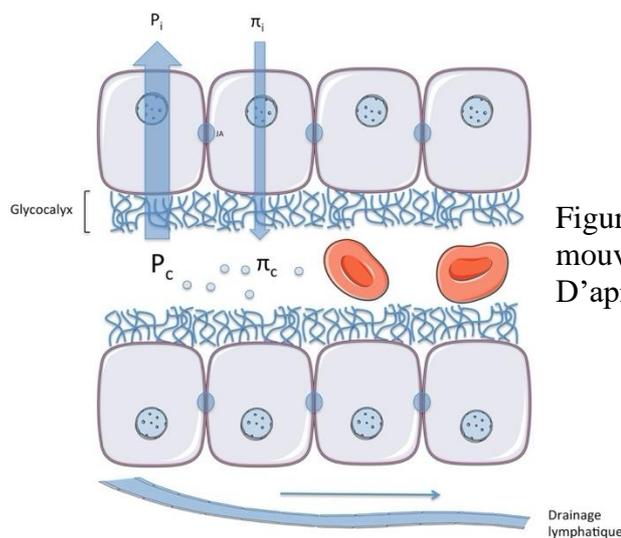


Figure 8 : représentation schématique des mouvements hydriques transendothéliaux. D'après Besnier *et al* Réanimation 2015.

Ce modèle historique a été récemment précisé, notamment impliquant le rôle du glycocalyx (cf supra). Cette fine couche de glycosaminoglycanes à la surface de la cellule endothéliale réalise une membrane semi-perméable aux protéines chargées négativement (telles que l'albumine), les retenant dans la lumière vasculaire<sup>118</sup>. Ainsi la force motrice principale serait le gradient de pression hydrostatique entre les espaces

vasculaires et sous-glycocaliens, contrebalancé par un gradient de pression oncotique inverse entre ces deux compartiments. La diffusion se fait ensuite soit par voie para-cellulaire entre les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales, soit par transcytose cellulaire pour certaines protéines<sup>119</sup>. La présence du glycocalyx à la surface endothéliale n'autorise pas le flux d'eau en sens inverse, la résorption du liquide interstitiel s'opérant alors grâce au système lymphatique.

Un stress inflammatoire majeur peut être responsable d'une dégradation rapide du glycocalyx, comme l'atteste l'augmentation des taux circulants des produits issus du glycocalyx tels que le syndecan-1 ou l'héparin-sulfate<sup>120-122</sup>. Cette altération a été identifiée expérimentalement comme responsable d'une fuite vasculaire. Ainsi les travaux de Rehm *et al* sur cœur isolé de porc mirent en évidence que l'altération du glycocalyx induisait une extravasation de sérum salé à 0,9% et que la destruction du glycocalyx entraînait également une fuite des colloïdes<sup>118</sup>. L'altération du glycocalyx au cours du sepsis pourrait donc être impliquée dans l'hyperperméabilité observée, et est identifiée comme associée à la surmortalité<sup>123</sup>.

Cependant la seule dégradation du glycocalyx n'explique pas complètement les mécanismes de fuite hydrique. En effet, les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées ou des jonctions adhérentes, censées « imperméabiliser » l'endothélium. Les jonctions adhérentes sont composées de plusieurs protéines dont les *Vascular Endothelial Cadherins* (VE-cadhérines), elles mêmes reliées au réseau d'actine par des caténines. La force de liaison entre les VE-cadhérines de deux cellules voisines peut cependant être modulée par leur degré de phosphorylation. Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est un élément primordial de cette régulation. Cette molécule est produite à l'état physiologique essentiellement par l'endothélium, les leucocytes et plaquettes circulants et les cellules épithéliales pulmonaires. L'activation du récepteur au VEGF induit une cascade de phosphorylation intra-cellulaire responsable d'une dissociation des VE-cadhérines et d'une modification conformationnelle de la cellule endothéliale (*via* la modification de la tension du réseau d'actine), aboutissant à un élargissement de l'espace intercellulaire. Plusieurs études cliniques ont mis en évidence une augmentation des taux de VEGF au cours des processus inflammatoires, notamment septiques, ainsi qu'une augmentation du taux de son antagoniste naturel, le récepteur soluble au VEGF (sFlt-1). Ces points seront abordés plus précisément dans les sections suivantes.

## 1.6. Fuite capillaire au cours du sepsis

### 1.6.1. Mécanismes de l'hyperperméabilité capillaire au cours du sepsis

#### 1.6.1.1. Jonctions serrées et adhérentes

Le passage des protéines et des ions à travers la couche endothéliale sous glycocalienne procède selon 2 voies complémentaires. La voie transcellulaire est un mécanisme actif par lequel des protéines plasmatiques se lient à des protéines d'ancrage membranaire, telle que la gp60, à la surface endothéliale. Ces protéines interagissent ensuite avec la protéine cavéoline-1, induisant la formation de « cavéoles », vésicules contenant

les protéines ancrées ainsi que de l'eau et certains ions. Ces cavéoles sont ensuite adressées par polarisation du réseau d'actine jusqu'au pôle basal de la cellule endothéliale, jusqu'à l'exocytose des vésicules dans l'espace sous-endothélial. Ce processus nécessite la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'ATP, est probablement minoritaire, et complète la voie classique paracellulaire. La voie paracellulaire repose sur la modulation des jonctions intercellulaires que nous allons détailler par la suite.

Les cellules endothéliales sont reliées entre elles afin d'assurer une relative étanchéité vis-à-vis du secteur plasmatique, constituant une membrane semi-perméable régulant les flux d'eau, de protéines et de solutés. Les jonctions intercellulaires jouent un rôle primordial dans cette régulation des flux. Deux grands types de jonctions sont décrites au sein de l'organisme : les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Ces jonctions présentent la particularité d'être constituées de protéines transmembranaires liant les cellules entre elles, mais étant également reliées au cytosquelette d'actine par plusieurs complexes protéiques intracytosoliques, permettant un équilibre constant entre perméabilité et contraction/dilatation cellulaire. Ces ensembles sont soumis à des phénomènes de régulation à la fois intracellulaire et extracellulaire. Nous n'aborderons pas ici le rôle des *gap-junctions* réalisant des canaux de communication entre les cellules, avec transfert d'eau et de molécules de signalisation<sup>126</sup>.

Les jonctions serrées présentent une structure en fermeture éclair très serrée, constituée des protéines transmembranaires claudines et occludines couplées au cytosquelette d'actine *via* des protéines sous-membranaires d'interaction telles que les *zonula occludens* (ZO-1, 2 et 3), cinguline et paracinguline<sup>127</sup>. Les claudines et occludines présentent 4 domaines transmembranaires et interagissent avec la portion extracellulaire de la cellule voisine. Les ZO permettent la liaison entre les claudines et les filaments d'actine, *via* les  $\beta$ -caténines, et ainsi la stabilisation de la structure, mais également la régulation de l'ouverture de l'espace intercellulaire selon la contraction du cytosquelette. La jonction serrée est également stabilisée par la protéine transmembranaire *Junctional Adhesion Molecule* (JAM), dont la liaison est régulée par ZO-3 et un complexe sous-membranaire incluant la protéine régulatrice Cdc42 (figure 10). La protéine JAM intervient également dans les processus de migration leucocytaire paracellulaire (cf supra). Ces jonctions serrées sont particulièrement imperméables et sont majoritaires au sein de la barrière hémato-encéphalique et de la microvascularisation rétinienne, mais sont également présentes dans un grand nombre de type cellulaire : entérocytes, cellules épithéliales muqueuses ou cutanées... Le niveau d'imperméabilité de l'endothélium est modulé par la densité des jonctions serrées et leur niveau d'organisation. Ainsi une grande concentration est observée dans l'arbre vasculaire cérébral tandis que la densité et le niveau d'organisation est plus faible au niveau des veinules post-capillaires de nombreux organes, lieu d'échange privilégié entre les secteurs plasmatiques et interstitiels tant pour les protéines plasmatiques que pour les cellules immunitaires<sup>128,129</sup>.

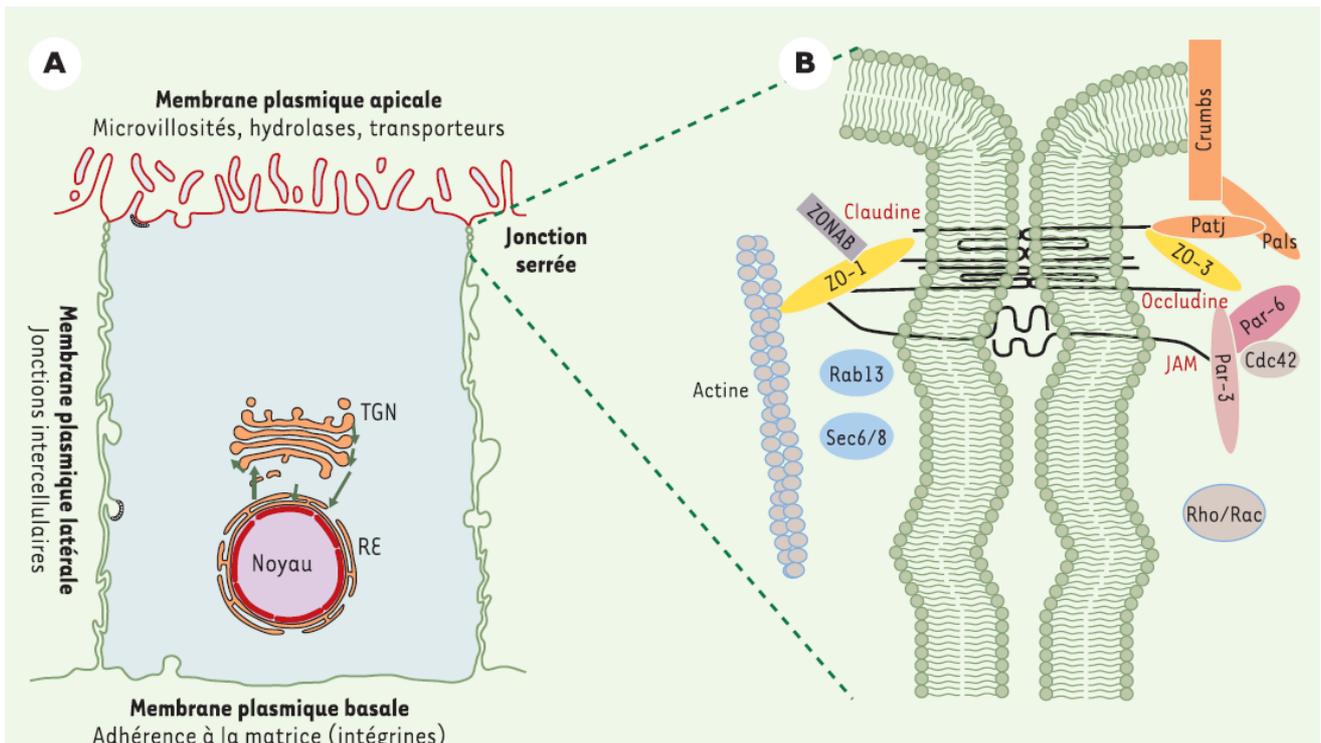


Figure 9 : représentation schématique d'une jonction serrée d'après Zahraoui Médecine/Sciences 2004.

Les jonctions adhérentes réalisent quant à elles des connexions intercellulaires de moindre force à titre individuelle, mais les cellules endothéliales peuvent moduler l'expression membranaire de leurs composants afin d'augmenter leur quantité et donc la qualité globale de l'étanchéité. Elles reposent en grande partie sur les protéines transmembranaires *Vascular Endothelial Cadherins* (VE-cadhérines) dont la portion extracellulaire permet l'adhésion avec une VE-cadhérine de la cellule juxtaposée, selon un mécanisme dépendant du calcium. Le domaine intracellulaire est également relié au cytosquelette d'actine *via* des caténines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et p120)<sup>130,131</sup>. L'activité du cytosquelette semble primordiale à la stabilité de ces jonctions puisque la dépolymérisation des fibres d'actines induit une déstabilisation des VE-cadhérines *via* la perte de l'ancrage des caténines. Tout comme les jonctions serrées il existe une dynamique directe entre les forces de contraction intracellulaire et l'adhésion intercellulaire<sup>132</sup>. A cette fin, le domaine intracellulaire des VE-cadhérines se lie aux protéines  $\beta$ -caténines,  $\gamma$ -caténines et p120 sous forme d'un complexe liant d'autres protéines de liaison à l'actine, les *actin-binding proteins* (ABP) telles que  $\alpha$ -caténines, épilines et vinculines. Ces ABP participent à la contraction cellulaire *via* la liaison à la myosine. Ainsi l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, secondaire à l'augmentation de l'activité Phospholipase C (PLC) sous l'impulsion de divers stimuli (VEGF, histamine, inositol (1,4,5) triphosphate...), va entraîner la phosphorylation de la protéine *Myosin Light Chain* (MLC) grâce à la MLC Kinase selon un mécanisme dépendant du complexe Calmodulin/ $\text{Ca}^{2+}$ , permettant l'interaction actine/myosine. Cette interaction génère une force de contraction rétractile, laquelle va induire une augmentation des espaces intercellulaires du fait de la liaison du

cytosquelette d'actine avec les jonctions adhérentes et serrées<sup>124</sup>. La relation cytosquelette – jonctions cellulaires est donc primordiale à la régulation des flux trans-endothélium.

Les systèmes de jonctions cellulaires sont régulés par de multiples acteurs intra et extracellulaires. A l'état physiologique les GTPases intracellulaires Rac-1, RhoA et Cdc42 jouent un rôle crucial dans la perméabilité capillaire. La protéine Rac-1 stabilise la liaison actine - VE-cadhérines en renforçant l'affinité des protéines de liaison à l'actine, mais renforce également l'affinité des VE-cadhérines pour leur homologue des cellules adjacentes<sup>133</sup>. Rac-1 est activée par phosphorylation suite à plusieurs voies de signalisation. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc entraîne une augmentation de l'activité Rac-1<sup>134</sup>. Parallèlement l'exposition de la cellule endothéliale à certains facteurs extracellulaires active de même Rac-1. C'est le cas de l'angiopoietine-1, synthétisée par les cellules musculaires lisses vasculaires, les péricytes et les monocytes circulants. Sa liaison à son récepteur Tie-2, récepteur tyrosine kinase, induit une phosphorylation de Rac-1 par la voie PI3K/Akt<sup>133</sup>. La protéine Cdc42 présente des propriétés relativement similaires mais dans le système des jonctions serrées<sup>105,106,124</sup>. A l'inverse la protéine RhoA présente un effet plutôt inhibiteur sur la jonction adhérente en réponse à de multiples facteurs (VEGF, histamine, adhésion leucocytaire...) <sup>124</sup>. Cet effet est notamment secondaire à une phosphorylation indirecte de la MLC *via* sa kinase effectrice ROCK, mais également en favorisant l'entrée de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, résultant en une augmentation de la contraction cellulaire<sup>124,135</sup>. Un autre élément important de la fonction « barrière » endothéliale est l'activité phosphatase sous membranaire. Une déphosphorylation constante est nécessaire à la stabilisation des jonctions adhérentes, puisque la phosphorylation sur certains sites tyrosines des VE-cadhérines induit une endocytose de celles-ci et donc une diminution des interactions cellule-cellule. Les phosphatases VE-PTP, DEP-1 ou SHP-2, pour ne citer qu'elles, stabilisent donc les jonctions adhérentes par déphosphorylation continue des VE-cadhérines et des  $\beta$  et  $\gamma$ -caténines<sup>127</sup>.

#### 1.6.1.2. Modulation de la barrière endothéliale au cours de l'inflammation

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle majeur dans la déstabilisation des jonctions adhérentes au cours du sepsis. Ainsi le TNF $\alpha$  et le LPS bactérien entraînent une diminution de la quantité d'AMPc disponible *via* l'activation de leur récepteur spécifique TNF $\alpha$ R et TLR4. L'AMPc est un élément important de la stabilisation des jonctions cellulaires. Il active la Protéine Kinase A (PKA), stabilisant le réseau d'actine et inhibant l'activité MLCK (et donc l'interaction actine-myosine), diminuant ainsi les forces de rétraction cellulaire<sup>124</sup>. De plus la baisse de ses taux intracellulaires induit une diminution de l'activité Rac-1, une activation de RhoA, et une déstabilisation des jonctions adhérentes par endocytose des VE-cadhérines<sup>127,136</sup>. En sus de ces effets sur la rétraction cellulaire, l'activation de ces récepteurs inflammatoires entraînerait également une activation de la protéine kinase Src phosphorylant les VE-cadhérines en Y658 et conduisant ainsi à l'endocytose de ces molécules d'adhésion. L'IL-1 jouerait également un rôle en diminuant l'expression

des  $\beta$ -caténines, des occludines, de ZO-1 et des VE-cadhérines, et en augmentant la production de R-spondin3 et de VEGF, deux facteurs impliqués dans la perméabilité capillaire<sup>137</sup>. L'IL-6 est également un facteur pro-perméabilisant. Sa liaison avec son récepteur soluble circulant (sIL-6R) permet l'activation de la protéine membranaire gp130, responsable de la phosphorylation des VE-cadhérines et donc le relâchement intercellulaire<sup>23</sup>. D'autres facteurs extracellulaires sont à même de déstabiliser les jonctions adhérentes, notamment certaines molécules de la famille des angiopoïétines et celles de la famille des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), qui exercent leur action cellulaire *via* leurs récepteurs à tyrosine kinase (figure 10).

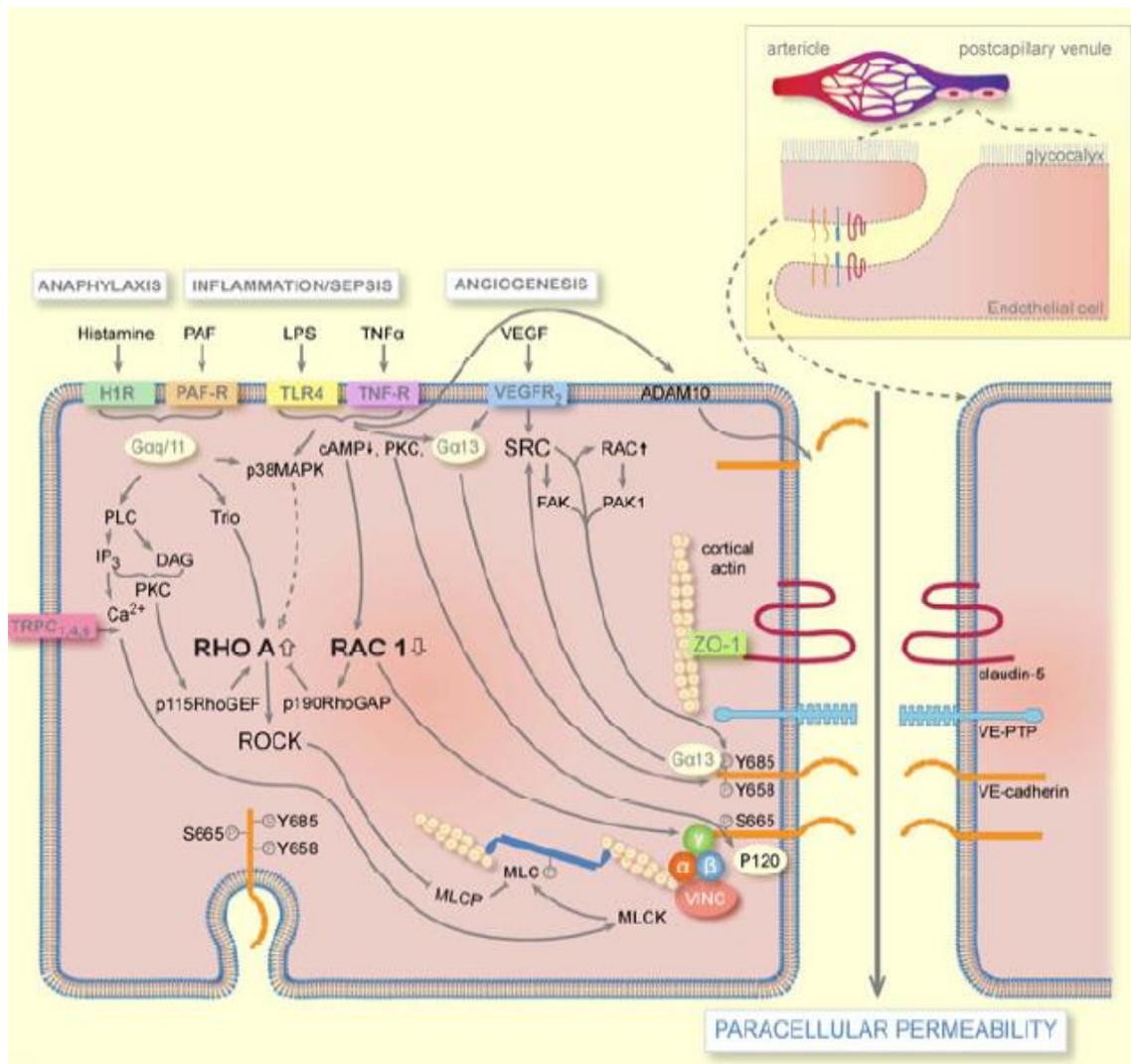


Figure 10 : modulation de la barrière endothéliale lors de l'inflammation. D'après Radeva *et al Acta Physiol* 2018.

### 1.6.1.3. Système Angiopoïétine dans le sepsis

Les angiopoïétines appartiennent à une famille de facteurs (Ang1-4) associés aux récepteurs à tyrosine kinase Tie (Tie-1 et Tie-2). Ces récepteurs sont quasiment exclusivement exprimés dans l'endothélium, et *a minima* dans les leucocytes<sup>138,139</sup>. Comme évoqué plus haut, l'activation du récepteur Tie-2 est un élément

important de la stabilisation des jonctions adhérentes. La liaison de l'Ang1 à ce récepteur induit une activation de la voie PI3K/Akt, responsable de l'activation de la GTPase Rac-1 essentielle dans le maintien des VE-cadhérines à la surface cellulaire, et participe au renforcement des interactions cellule-cellule<sup>140</sup>. Ainsi, l'inactivation du gène codant pour Tie-2 était associée à une augmentation de la fuite capillaire dans des modèles de sepsis et à une augmentation de la gravité de l'infection, témoin à la fois de l'importance de la voie Tie-2 dans la régulation de la barrière endothéliale, et de l'importance de l'intégrité de cette barrière dans la sévérité de l'infection<sup>141</sup>. La réduction de l'activité Tie-2 au cours du sepsis résulte de plusieurs mécanismes : diminution de l'expression de Tie-2 et d'Ang1, génération de récepteurs Tie solubles chélatant Ang1, activité antagoniste de Ang2 sur Tie-2<sup>138</sup>.

L'Ang2 est un facteur produit essentiellement par les cellules endothéliales. Sa concentration plasmatique à l'état physiologique est faible et il est en majeure partie stocké dans les corps de Weibel Palade (tout comme le vWf). Les forts taux de cytokines pro-inflammatoires et de VEGF au cours des processus inflammatoires aigus sont cependant responsables d'une augmentation importante des taux d'Ang2<sup>142</sup>. Ainsi il a été démontré que la liaison de composants de paroi des bactéries à gram négatif au récepteur TLR-2 était responsable d'une sécrétion des corps de Weibel Palade tandis que l'exposition de l'endothélium au LPS induisait une diminution de l'expression du récepteur Tie-2 et de l'Ang1, ainsi qu'une augmentation de l'expression d'Ang2, témoins des nombreuses modalités de régulation de la voie Tie au cours du sepsis<sup>138,143</sup>. L'Ang2 est impliquée dans de nombreux processus, notamment dans l'activation des cellules endothéliales, augmentant par effet autocrine l'expression des glycoprotéines d'adhésion leucocytaire (ICAM-1, VCAM-1), mais également de façon paracrine en activant les leucocytes circulants. Il présente également des effets chémoattractant et aurait aussi un effet délétère sur le glycocalyx, notamment par la destruction spécifique de l'héparane sulfate<sup>144</sup>. Enfin, il présente des effets antagonistes de l'activité du récepteur Tie-2, inhibant sa phosphorylation par l'Ang1, et il en résulte donc une baisse de l'activité Rac-1 et par voie de conséquence une déstabilisation des jonctions adhérentes<sup>136</sup>. Au cours du sepsis un déséquilibre était observé entre les taux d'Ang1/Ang2 en faveur de l'Ang2 et un ratio élevé était significativement associé à la mortalité à 28 jours, témoin de l'importance de cette voie dans la dysfonction d'organes<sup>146</sup>.

Cibler la voie Tie pourrait donc être d'intérêt dans les processus septiques graves. Dans un modèle murin inflammatoire par injection de LPS, l'administration d'Ang1 recombinant limitait l'activation endothéliale, améliorait le débit et l'inotropisme cardiaque, réduisait l'agression pulmonaire et rénale, résultant en une diminution de la mortalité<sup>147,148</sup>. Des résultats similaires étaient retrouvés dans un modèle murin de sepsis par ligature et ponction caecale, avec une diminution de la fuite capillaire pulmonaire, une diminution des molécules d'adhésion et de l'infiltrat leucocytaire tissulaire<sup>149</sup>. De même, des stratégies visant à réduire les taux d'Ang2 étaient efficaces dans des modèles de sepsis. L'administration de petits ARN interférants (*siRNA*) contre Ang2 diminuait l'expression pulmonaire de cytokines pro-inflammatoires et d'ICAM-1, l'infiltrat

leucocytaire et améliorerait la survie<sup>150</sup>. De même l'utilisation d'anticorps anti-Ang2 améliorerait la mortalité dans un modèle endotoxinique<sup>151</sup>. Une approche novatrice est l'utilisation d'un anticorps Anti-Ang2 activateur de Tie-2 : la liaison de l'anticorps avec l'Ang2 transforme le complexe en activateur de Tie-2, permettant à la fois d'inhiber la voie Ang2 et de stimuler la voie Ang1. Son utilisation dans des modèles septiques par ligature caecale ou par administration de *Staphylococcus Aureus* améliorerait la survie et la dysfonction d'organe par rapport à un anticorps anti-Ang2 traditionnel<sup>138,152</sup>. A ce jour aucun essai clinique humain n'a testé des thérapies anti-Ang2 dans le sepsis.

#### 1.6.1.4. Signalisation VEGF au cours du sepsis

##### 1.6.1.4.1. VEGF et VEGF-R

Les *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) sont une famille de protéines impliquées dans de nombreux processus physiologiques : migration cellulaire, mitogénèse, angiogénèse, vasodilatation, chémoattraction leucocytaire, perméabilité vasculaire. Cette famille contient actuellement les protéines principales : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le *Placental Growth Factor* (PlGF), chacune de ces protéines pouvant exister sous plusieurs isoformes par épissage alternatif des ARNm. Trois récepteurs aux VEGFs sont actuellement identifiés : VEGF-R1 (flt1), VEGF-R2 (flk1 chez la souris et KDR chez l'Homme) et VEGF-R3 (flt4). Les VEGF-R appartiennent à la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Ils présentent un domaine extracellulaire liant le VEGF, un domaine transmembranaire hydrophobe, et un domaine intracellulaire à activité kinase. Ce dernier comporte une partie N-terminale capable de fixer l'ATP et le Ca<sup>2+</sup> et une partie C-terminale à activité phosphotransférase permettant l'autophosphorylation des résidus tyrosines et l'activation de la fonction kinase<sup>153,154</sup>. Ils sont exprimés par les cellules endothéliales, hématopoïétiques, vasculaires lisses et macrophagiques<sup>153</sup>. Au sein de ce système, le VEGF-A, communément appelé VEGF, est le ligand le plus étudié et fait même l'objet de thérapies ciblées dans certains cancers et dans les altérations microvasculaires de la rétine. Ce peptide appartient à la super-famille des « boucles cystéines » contenant un nœud central entouré de deux domaines riches en cystéines, reliés par des ponts disulfures, résultant en une conformation repliée en boucle<sup>155</sup>. Il est synthétisé classiquement sous plusieurs isoformes de longueurs différentes par épissage alternatif : VEGF<sub>110</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Le VEGF<sub>165</sub> est responsable de la plupart des effets vasculaires du système VEGF et est synthétisé par les cellules endothéliales de façon constitutive, mais également par tout type cellulaire en conditions d'hypoxie ou de stress, et notamment par les leucocytes, les plaquettes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et un grand nombre de cellules néoplasiques<sup>153,156,157</sup>. Il existe sous deux formes issues d'épissage différent de l'ARNm, le VEGF<sub>165a</sub> et le VEGF<sub>165b</sub>.

#### 1.6.1.4.2. VEGF et perméabilité vasculaire

Le VEGF<sub>165a</sub> est le principal responsable des effets pro-perméabilisants de ce système<sup>158</sup>. Il se lie préférentiellement aux récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2, principaux vecteurs de l'hyperperméabilité liée à ce système. La dimérisation de ces récepteurs, secondaire à la liaison du VEGF, est indispensable à leur activité. Il s'ensuit une modification de la conformation du domaine intracellulaire, permettant l'interaction de la portion N-terminale liant l'ATP avec la portion C-terminale à activité phosphotransférase. Le VEGF-R est alors phosphorylé en plusieurs sites tyrosine : Y1095, Y1175, Y1214 et surtout Y951 présentant l'activité kinase. L'activité de ce dernier site permet la transduction cellulaire par plusieurs voies. La phosphorylation de la protéine sous membranaire TAd active ensuite la protéine Src, elle-même impliquée dans la phosphorylation et l'endocytose des VE-cadhérines. De plus, le récepteur activé induit l'activation de la PLC $\gamma$ , impliquée dans la contraction du cytosquelette *via* l'activation de la PKC et l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> (cf supra et figure 10)<sup>159</sup>. Enfin, les sites Y1175 et Y1214 phosphorylés participent au recrutement de la protéine FAK et à la réorganisation du cytosquelette *via* la p38-MAPK<sup>153</sup>. Il apparaît ainsi que l'activation du VEGF-R (essentiellement VEGF-R2) participe à la perméabilité capillaire en déstabilisant les jonctions adhérentes et en modulant la tension du cytosquelette. Cet effet pro-perméabilisant du VEGF est observé *in vivo* dès la première minute, avec un premier pic d'effet à 1 heure, suivi d'un deuxième pic au bout de plusieurs jours (figure 11). Cette variation d'effet est, au moins en partie, due à une endocytose des VEGF-R2 15 à 20 minutes après leur stimulation, selon plusieurs mécanismes, dépendant ou non de la clathrine<sup>153,160,161</sup>. Le second pic de perméabilité est probablement dû à un réadressage des vésicules d'internalisation vers la membrane plasmatique, notamment grâce à une déphosphorylation des VEGF-R2 par des phosphatases, dont la PTP1B, et l'activation des molécules d'adressage de la famille Rab<sup>153</sup>.

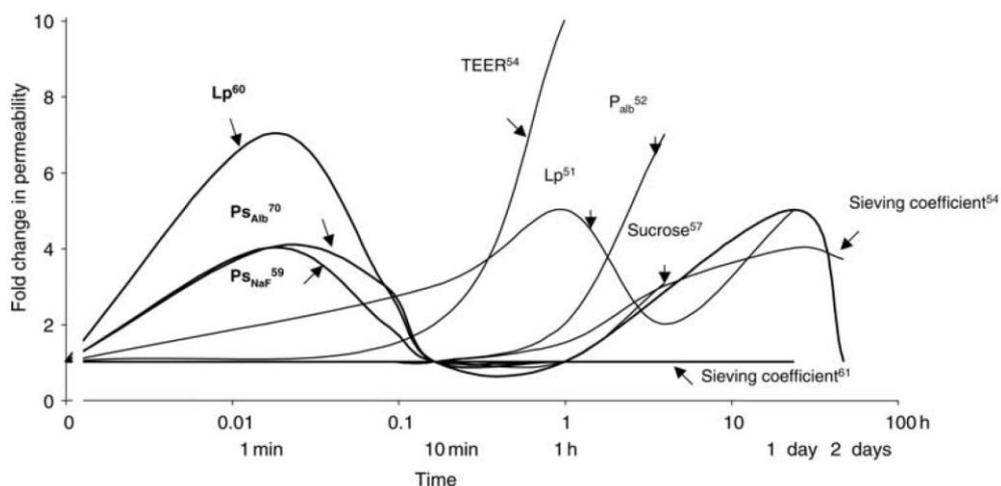


Figure 11 : perméabilité capillaire secondaire au VEGF au cours du temps. D'après Bates, Cardiovasc Res 2010. Courbe en gras : *in vivo*. Courbe classique : *in vitro*. Evaluation par différentes méthodes : Lp : conductivité électrique hydraulique, PSAlb : albumine marquée, PSNaF : Na marqué à la fluorescéine, TEER : ions marqués avant et après sucrose.

#### 1.6.1.4.3. VEGF en pathologie

On conçoit ainsi que le couple VEGF(-A) et son récepteur préférentiel VEGF-R2 joue un rôle fondamental dans les processus de perméabilité vasculaire, à la croisée entre les forces de rétraction cellulaire et la fonction adhérente elle-même. Si ce processus permet d'assurer des fonctions essentielles vasculaires en physiologie (afflux leucocytaire, néoangiogenèse, migration cellulaire), l'activation dérégulée de ce système induit des modifications substantielles et délétères dans certaines situations, avec possiblement apparition d'œdème local et d'angiogenèse aberrante. Ainsi la production de VEGF est augmentée par l'hypoxie de cellules tumorales lors de cancers à un stade avancé, responsable d'un œdème tumoral et péri-tumoral, ainsi que d'un relâchement endothélial et d'une néovascularisation aberrante favorisant l'invasion néoplasique et les métastases<sup>156,162,163</sup>. L'inhibition de cette voie de signalisation fait actuellement l'objet d'une thérapie ciblée dans de multiples cancers métastatiques (rein, colon, poumon, sein) avec l'utilisation de l'anticorps monoclonal bevacizumab (Avastin®, Roche, France). D'autres situations cliniques sont à même d'augmenter les taux de VEGF. Ainsi les patients souffrant de syndrome de fuite capillaire idiopathique, ou syndrome de Clarkson, présentent des taux élevés de VEGF<sup>164,165</sup>. Le VEGF participerait, de concert avec le système Tie2/Ang2, à la fuite capillaire massive observée chez ces patients. L'utilisation du bevacizumab pourrait là encore être d'intérêt pour bloquer cette voie de signalisation. Cependant la pathologie est exceptionnelle, ne permettant pas à ce jour d'essai clinique sur la thématique. Nous avons décrit, en collaboration avec le service de réanimation cardiaque, le service de médecine interne et l'Inserm U1096, le cas clinique d'une patiente présentant un choc cardiogénique réfractaire au cours d'un syndrome de Clarkson, avec taux élevés de VEGF. Le traitement par bevacizumab a été administré en thérapie de sauvetage, permettant une récupération de la fonction cardiaque, une diminution du syndrome œdémateux, une négativation de la balance hydrique et *in fine* une sortie de l'hôpital sans séquelle (annexe 3).

Les taux de VEGF sont également élevés chez les patients critiques, et tout particulièrement au cours du sepsis. Cette élévation est en partie secondaire au stress inflammatoire. Les cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, induisent une augmentation de l'expression du VEGF, notamment par les voies JAK/STAT3 et MAPKinases<sup>166</sup>. Dans une étude observationnelle portant sur 83 patients admis aux urgences pour suspicion d'infection, le taux de VEGF était plus élevé chez les patients atteints de choc septique à l'admission et à 24 heures, et les taux étaient relativement corrélés avec l'intensité du profil inflammatoire (taux d'IL-6,  $r=0.49$ )<sup>167</sup>. Dans une autre étude observationnelle portant sur l'étude ancillaire de l'essai clinique ProCESS et incluant 605 patients en choc septique, les taux de VEGF étaient paradoxalement plus bas chez les non-survivants<sup>168</sup>. Cette étude illustre les résultats parfois discordants sur l'association entre taux de VEGF et sévérité des patients, avec des études montrant au cours du choc septique des taux élevés<sup>167,169</sup>, abaissés<sup>168,170</sup> ou non modifiés<sup>171</sup>, reflétant les difficultés techniques à doser ce peptide en pratique courante. Le dosage est actuellement réalisé par méthode ELISA et la fiabilité de détection dépend grandement de la sensibilité du kit

et donc de l'anticorps utilisé, notamment des épitopes visés. En effet, certains anticorps ne sont pas capables de détecter certaines isoformes du VEGF alors même que nous avons vu précédemment que celles-ci sont nombreuses, et si le VEGF<sub>165a</sub> est le plus répandu, l'action de l'isoforme VEGF<sub>121</sub> est assez similaire sur le VEGF-R2, mais celle-ci n'est pas nécessairement détectée par tous les tests. De plus, la liaison du récepteur soluble VEGF-R1 (sFlt1) avec le VEGF circulant pourrait masquer les épitopes ciblés par certains kits ELISA et rendre le VEGF faussement indétectable<sup>172</sup>. Ce récepteur soluble sFlt1 est un variant d'épissage du VEGF-R1 produit par les cellules endothéliales et les monocytes. L'augmentation de ses taux sériques est bien documentée comme facteur de gravité dans différentes situations pathologiques, telles que la pré-éclampsie<sup>173</sup> mais également au cours du sepsis. Ainsi des taux élevés étaient observés dans toutes les études s'intéressant au sFlt1 au cours du sepsis. Ces taux étaient significativement associés à la mortalité et le sFlt1 présentait la meilleure performance prédictif de mortalité ou de dysfonction d'organe comparativement avec les autres marqueurs de dysfonction endothéliale (E et P-selectin, ICAM-1, VCAM-1, IL-6...), avec une aire sous la courbe ROC comprise entre 0.77 et 0.82<sup>103,168,174</sup>. Ce marqueur semble de plus ne pas être soumis aux aléas techniques comme peut l'être le VEGF. Du point de vue physiologique, l'augmentation de production du sFlt1 pourrait être un mécanisme adaptatif visant à limiter les effets délétères du VEGF en empêchant sa liaison à son récepteur membranaire. Ceci a donc suggéré le blocage de cette voie de signalisation au cours du sepsis. Nous avons évoqué plus haut l'utilisation du bevacizumab au cours de processus pathologiques impliquant la voie du VEGF. Le bevacizumab est le premier anticorps monoclonal recombinant et humanisé dirigé contre le VEGF. Il a été développé chez la souris contre l'isoforme VEGF<sub>165</sub> puis humanisé par remplacement des chaînes lourdes et légères par des séquences humaines. Contrairement à d'autres anticorps anti-VEGF plus récent (pegaptanib), il cible toutes les isoformes de VEGF-A (acides aminés 81-92 du domaine de liaison VEGF/VEGF-R), il est donc caractérisé comme un anticorps anti-panVEGF<sup>175</sup>. Il a actuellement l'autorisation d'utilisation dans de multiples cancers à stade avancé, mais également au cours de la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la rétinopathie diabétique en bloquant l'angiogenèse anormale et l'œdème tissulaire. Son utilisation au cours des processus septiques est donc théoriquement d'intérêt afin de réduire la fuite capillaire et la dysfonction d'organe. Un seul travail s'était intéressé à ceci. Jeong *et al.* avaient alors étudié l'impact du bevacizumab dans 3 modèles inflammatoires : culture de cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVECs) stimulées au LPS, choc endotoxinique au LPS chez la souris et sepsis par ligature et ponction caecale chez la souris<sup>176</sup>. L'utilisation du bevacizumab était responsable d'une diminution de l'expression génique et protéique de marqueurs inflammatoires *in vitro* (IL-6, *Monocyte Chemotactic Protein 1*, RANTES), d'une diminution de la fuite capillaire dans le poumon, la rate et le rein de souris endotoxiniques, et une diminution de la mortalité dans le modèle endotoxinique et septique abdominal. La mortalité était améliorée par le pré-traitement mais aussi le post-traitement et par une dose de 0.1 mg/kg. La dose de 1 mg/kg n'était pas associée à un meilleur pronostic que le placebo. Cette divergence quant aux effets doses était

probablement due à des effets secondaires du bevacizumab. L'inhibition du VEGF peut en effet être responsable d'une altération des processus de cicatrisation<sup>177,178</sup>. Malgré ces résultats prometteurs, les mécanismes expliquant précisément les effets bénéfiques du bevacizumab dans le sepsis ne sont pas connus. L'étude de Jeong avait en effet permis de démontrer une réduction de la fuite capillaire par l'utilisation du bevacizumab, complétant les premières descriptions cliniques retrouvant une corrélation entre taux de VEGF élevés et syndrome de fuite capillaire clinique dans une population septique pédiatrique<sup>179</sup>. Cependant ces résultats nécessitent une confirmation et un approfondissement des mécanismes responsables avant de pouvoir envisager une transposition à l'Homme. Ceci a fait l'objet de la deuxième partie de ce doctorat publiée sous forme de lettre à l'éditeur dans la revue *Critical Care*.

### 1.6.2. Approche clinique de la fuite capillaire

L'altération de la perméabilité capillaire au cours des processus inflammatoires induit un passage d'eau et de solutés depuis la lumière vasculaire vers le secteur interstitiel, résultant en une accumulation d'eau dans les tissus. Ce phénomène est aggravé par les besoins parfois importants en solutés d'expansion volémique afin de restaurer la précharge cardiaque, alors même que 50% de ces patients présentent une insuffisance rénale<sup>180,181</sup>. Ceci se traduit cliniquement par un syndrome oedémateux avec aspect infiltré des tissus sous-cutanés, mais également infiltration d'organes vitaux dont la fonction est altérée par l'accumulation d'eau, pouvant conduire à la dysfonction d'organe. L'œdème tissulaire induit en effet une déstructuration du tissu pouvant altérer sa fonction (infiltration pulmonaire, œdème myocardique, cérébral, musculaire, congestion hépatique...). Une autre explication à la gravité de ce syndrome oedémateux pourrait être l'augmentation de la distance séparant les cellules de la microcirculation (vaisseaux de taille inférieure à 150 µm, comprenant artérioles, capillaires et veinules, site préférentiel d'échange entre circulation et tissus). L'oxygénation tissulaire est le résultat de la diffusion passive des gaz à travers les membranes cellulaires selon leur gradient de concentration. L'augmentation de volume de l'interstitium suite à l'accumulation d'eau risque donc de diminuer la quantité d'oxygène disponible pour les cellules. Ce défaut local d'oxygénation peut être aggravé par la diminution du débit sanguin.

Au sein du parenchyme pulmonaire, l'augmentation du volume intravasculaire entraîne une infiltration parenchymateuse dépassant les capacités lymphatiques, puis une diffusion liquidienne vers l'alvéole, conduisant à une faible diffusion des gaz responsable d'une hypoxémie<sup>182</sup>. Ainsi les patients admis pour Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu et présentant une eau pulmonaire et un index de perméabilité vasculaire pulmonaire élevés, évalués par thermodilution transpulmonaire, présentaient un pronostic moins favorable<sup>183</sup>. Dans l'étude FACTT, l'utilisation d'une stratégie restrictive d'administration des fluides chez des patients présentant un *Acute Lung Injury* améliorait l'oxygénation et diminuait la durée de ventilation mécanique<sup>184</sup>. Au niveau cardiaque, l'infiltrat myocardique peut se traduire par une diminution de la force

contractile cardiaque avec une altération de la conduction de l'influx électrique, pouvant conduire à l'apparition d'un défaut d'inotropisme et/ou de troubles conductifs majeurs, responsables *in extremis* d'un choc cardigénique. Il a ainsi été démontré dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque post-ischémique que la présence d'œdème cardiaque était associée à une altération de la fonction ventriculaire gauche<sup>185</sup>. Environ 50% des patients en choc septique présentent une cardiomyopathie septique avec altération de la fonction ventriculaire gauche<sup>186,187</sup>. L'infiltrat oedémateux cardiaque pourrait donc participer ou aggraver cette défaillance. La défaillance cardio-circulatoire est un élément majeur au sein de l'altération de la perméabilité vasculaire, à la fois cause et conséquence de celle-ci. En effet, la défaillance circulatoire initiale nécessite une expansion volémique qui peut parfois dépasser les objectifs, conduisant à une hypervolémie majorant la fuite capillaire. L'excès de remplissage vasculaire a été récemment démontré comme indépendamment associé à une dégradation du glycocalyx au cours du sepsis, avec augmentation des produits de dégradation : heparan sulfate et syndecan-1, mais également associé à la mortalité dans l'analyse rétrospective d'une cohorte de plus de 23 000 patients admis pour sepsis ou choc septique<sup>188,189</sup>. Dans cette dernière étude, une expansion volémique supérieure à 5L était associée à la mortalité, indépendamment de la gravité du patient. Une étude expérimentale de choc endotoxinique mettait en évidence que l'administration de fluides d'expansion volémique induisait une augmentation de la dysfonction vasculaire avec augmentation des besoins en noradrénaline<sup>190</sup>. Là encore on peut émettre l'hypothèse que la dégradation du glycocalyx intervient dans la pathogenie de cette dysfonction vasculaire puisque celui-ci est indispensable à la perception des *shear stress* du flux sanguin, et à la vasoréactivité associée. De plus, l'hypervolémie induit elle-même une dilatation des cavités cardiaques avec sécrétion de peptide natriurétique toxique pour le glycocalyx<sup>191</sup>. Enfin, l'altération de la fonction ventriculaire droite peut survenir au cours du choc septique, engendrant une congestion veineuse et donc une augmentation du gradient de pression hydrostatique transcapillaire<sup>192</sup>. Ce raisonnement peut être transposé à la plupart des organes vitaux, et tout particulièrement les organes encapsulés ne disposant que de peu d'espace de dilatation. Ainsi, l'augmentation de la pression tissulaire rénale induit une diminution du débit de filtration rénale et de la perfusion sanguine, réalisant un véritable « syndrome du compartiment rénal »<sup>193</sup>. Dans une cohorte de plus de 1000 patients en choc septique, Payen *et al* mirent en évidence qu'une balance hydrique positive était associée à une plus grande incidence d'*Acute Kidney Injury* et que l'association AKI et balance hydrique était un marqueur indépendant de mortalité avec un *hazard-ratio* de 1.20<sup>194</sup>. De même au niveau du foie, l'engorgement des sinusoides hépatiques pourrait être responsable d'une diminution de la fonction hépatique, et participer à l'atteinte hépatique fréquemment observée au cours du choc septique<sup>195</sup>.

La gestion de la volémie au cours du choc septique est donc un enjeu important et difficile. L'hypovolémie est responsable d'une diminution de la pré-charge cardiaque et donc d'une inadéquation entre le débit cardiaque et les besoins métaboliques, responsable d'une aggravation du pronostic. A l'inverse comme nous

venons de le voir, l'hypervolémie est responsable d'un syndrome oedémateux et d'une dysfonction d'organe corrélées au mauvais pronostic<sup>196</sup>. L'utilisation de marqueur performant pour évaluer la volémie est donc primordiale.

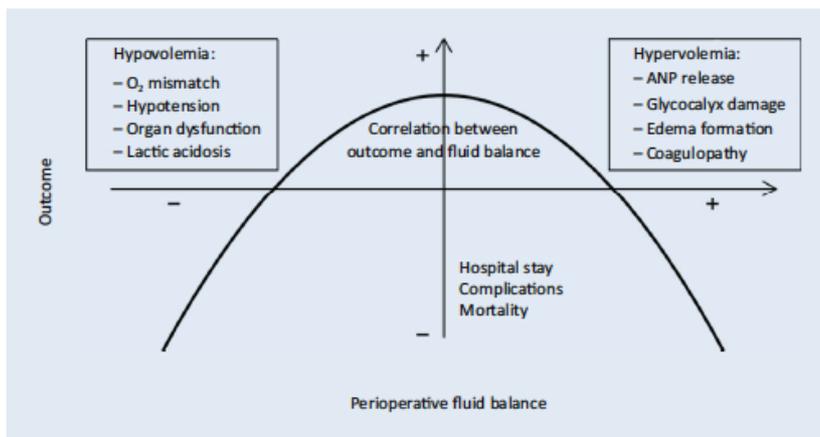


Figure 12 : impact de la volémie chez les patients de réanimation. D'après Rehm Anaesthesist 2019.

### 1.6.3. Patients critiques et balance hydrique

Il apparaît donc que l'accumulation de fluides au sein de l'organisme induit une dysfonction d'organe et puisse impacter sur la morbidité. Alsous *et al* identifiaient, il y a plus de 20 ans maintenant, que la balance hydrique positive (> 500 mL) était associée à la mortalité dans une cohorte de 36 patients admis pour choc septique<sup>197</sup>. La balance hydrique correspond à la différence entre les entrées hydriques (perfusion intraveineuse, expansion volémique, apports « parasites » ou « pirates » nécessaires à la dilution des traitements, alimentation, transfusion sanguine) et les sorties (diurèse, saignement, aspiration digestive, pertes insensibles cutanées, digestives ou respiratoires, épuration extra-rénale). Elle traduit l'accumulation de fluides dans l'organisme et est donc un reflet indirect du syndrome oedémateux précédemment décrit. Le calcul du bilan entrées-sorties, ou « balance hydrique », est laborieux mais est bien corrélée à la gravité des patients. Ainsi dans une autre étude portant sur 42 patients admis pour sepsis ou choc septique, une balance hydrique cumulée > 2,5L sur les 3 premiers jours était associée à la mortalité<sup>123</sup>. Dans une cohorte de 1800 patients septiques, une balance hydrique positive était observée pour tous les patients dans les 48 premières heures. Cependant, les patients survivants présentaient une négativation de leur balance hydrique à 72 heures, cette dernière étant indépendamment associée à la mortalité<sup>198</sup>. De plus, dans une cohorte de 2600 patients en sepsis sévère ou choc septique, la balance hydrique à 72 heures était associée à la mortalité, et ceci indépendamment de la présence d'une insuffisance rénale aiguë<sup>199</sup>. D'un point de vue physiologique, et probablement un peu simpliste, nous pouvons partir du postulat que les patients atteints d'un sepsis grave présentent à la phase initiale une fuite capillaire intense, responsable d'un syndrome oedémateux. Puisque la gravité initiale entre survivants et non-survivants étaient identiques dans ces études, nous pouvons émettre l'hypothèse que la

capacité à régénérer la fonction endothéliale pourrait être déterminante dans la survie en réduisant la fuite capillaire et donc la morbidité.

Bien que la littérature se soit grandement concentrée sur la fuite capillaire et la balance hydrique au cours du choc septique, ces altérations ne sont pas limitées à cette catégorie de patient critique. Les patients présentant un choc cardiogénique réfractaire nécessitant une assistance cardiaque par *ExtraCorporeal Membrane Oxygenation* (ECMO) présentent une mortalité proche de 50% toutes étiologies confondues, et une altération profonde de la microcirculation, tant en terme de densité vasculaire que de flux sanguins. Ainsi Yeh *et al* mirent en évidence chez 48 patients sous ECMO veino-artérielle une diminution de la microcirculation évaluée par microscopie *in vivo* sublinguale<sup>200</sup>. La proportion de microvaisseaux perfusés était même plus performante que la lactatémie à prédire la mortalité. De plus, dans un autre travail, Chommeloux *et al* observèrent que les patients sous ECMO pour choc cardiogénique présentaient une altération de la microcirculation importante avant l'implantation de l'assistance circulatoire, et que l'incapacité à récupérer de cette altération sous 24 heures était associée à la mortalité<sup>201</sup>. Les patients sous ECMO présentent une forte stimulation cytokinique réalisant un SIRS de tout premier ordre, renforçant les similitudes physiopathologiques avec les patients septiques<sup>202,203</sup>. Deux travaux ont évalué l'impact de la balance hydrique sur cette typologie de patients. Dans un premier travail, Schmidt *et al* observèrent chez 115 patients traités par ECMO veino-artérielle qu'une balance hydrique positive à 72 heures était associée à la mortalité<sup>204</sup>. Ce travail mettait pour la première fois en évidence une telle association au cours du choc cardiogénique réfractaire, mais présentait quelques limites. La principale était une sélection de patients cantonnée aux survivants aux 72 premières heures d'admission, alors que le pic de mortalité de ces patients se situe généralement dans les 3 premiers jours. Un autre travail rétrospectif sur 406 patients identifiait également la balance hydrique positive comme associée à la mortalité<sup>205</sup>. Il apparaît donc que l'accumulation de fluides est un bon reflet de la sévérité de ce type de patient. Il nous est cependant apparu que la littérature était encore trop faible sur le sujet, notamment avant d'envisager toute stratégie thérapeutique de restriction hydrique. Nous avons donc réalisé une étude de cohorte cherchant à confirmer l'association entre balance hydrique et mortalité dans une population non sélectionnée de patients traités par ECMO veino-artérielle, essayant de tenir compte des limites des 2 travaux rétrospectifs précédents. Nous avons de plus souhaité évaluer la pertinence de la prise de poids comme reflet plus simple de l'accumulation corporelle de fluide. Ceci a fait l'objet de la première partie de ce doctorat, publiée dans la revue *Shock*.

## 1.7. Place des solutés d'expansion volémique dans la fuite capillaire septique

Cette section a fait l'objet de la publication d'une mise au point dans la revue *Réanimation* en 2015 (Annexe 4)

Comme nous l'avons décrit plus haut, la gestion de la volémie est un élément majeur de la prise en charge hémodynamique du choc septique, notamment à la phase initiale. En effet, il est indispensable de trouver la volémie optimale afin d'éviter l'hypovolémie, responsable d'une hypo-perfusion d'organe par baisse du débit cardiaque, mais également d'éviter l'hypervolémie pouvant conduire à la défaillance d'organe (cf supra)<sup>196,206</sup>. La temporalité de la gestion volémique peut être synthétisée par « sauvetage, optimisation, stabilisation et désescalade ». A la phase initiale de « sauvetage », il est primordial de restaurer la volémie dite efficace par l'administration « généreuse » de solutés d'expansion volémique (EV), afin de restaurer la précharge et donc le débit cardiaque. Une fois la volémie restaurée, il est nécessaire d'affiner les paramètres hémodynamiques par l'utilisation raisonnée de ces mêmes fluides (phase d'« optimisation »). Pour cela, l'utilisation de paramètres dynamiques de précharge dépendance est indispensable. En effet l'utilisation de critères dits « statiques », c'est à dire des mesures ponctuelles de certains paramètres hémodynamiques tels que la pression pulmonaire d'occlusion ou la pression veineuse centrale, n'est pas performante pour identifier une hypovolémie répondant à l'expansion volémique<sup>180,207</sup>. L'utilisation de critères dits « dynamiques » est en revanche performante pour dépister les patients nécessitant une expansion volémique afin d'améliorer leur débit cardiaque. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'utilisation de la variation respiratoire de la pression pulsée<sup>208</sup>, les variations respiratoires des diamètres des veines caves inférieures<sup>209</sup> ou supérieures<sup>210</sup> à l'échocardiographie, l'augmentation du débit cardiaque après lever de jambe passif<sup>211</sup> ou encore le mini *fluid challenge*. Et enfin les phases de « stabilisation » et de « désescalade » consistent à gérer si nécessaire l'éventuel excès de fluides accumulé dans les tissus (diurétiques, épuration extra-rénale). L'ensemble de ces différents éléments ne sera pas détaillé plus profondément car en dehors du spectre de notre travail. Nous nous intéresserons en revanche à la nature du fluide administré dont les propriétés pharmacologiques peuvent influencer sur la fuite capillaire et la morbi-mortalité.

### 1.7.1. Volume et compartiment hydrique

L'utilisation de solutés d'EV a pour objectif de restaurer une volémie efficace au cours des situations d'états de choc, que ce soit dans des situations d'hypovolémie absolue comme les hémorragies aiguës ou les grandes déshydratations (diarrhée, grands brûlés...) ou lors de situations d'hypovolémie relative telles que les états septiques graves<sup>180,206</sup>. La restauration de la volémie a pour objectif la normalisation de la précharge cardiaque et donc l'amélioration du débit cardiaque jugé inadapté pour la condition observée.

Classiquement, l'eau corporelle représente 60% du corps humain soit un volume d'environ 45L pour un adulte mâle de 80 kg, répartie en environ 30L pour le compartiment intracellulaire et 15L pour le compartiment

extracellulaire (comprenant le secteur vasculaire pour 20% soit 3L et interstitiel pour 80% soit 12L environ). Seul le volume contenu dans le secteur vasculaire contribue à la circulation sanguine<sup>212</sup>. La diffusion de l'eau et de certaines petites molécules comme les électrolytes du secteur vasculaire vers l'interstitium s'effectue à travers l'endothélium capillaire et post-capillaire et est régie par la loi de Starling concernant les membranes biologiques semi-perméables selon l'équation précédemment décrite :  $J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma[\pi_c - \pi_i])$  où  $J_v$  est le débit net de fluides,  $K_f$  le coefficient de filtration dépendant de la membrane,  $P$  la pression hydrostatique,  $\pi$  la pression oncotique et  $\sigma$  le coefficient de réflexion oncotique<sup>117,213</sup>. Comme nous l'avons décrit plus haut l'endothélium et son glycocalyx jouent un rôle primordial en maintenant à distance, au sein de la lumière vasculaire, l'essentiel des ions et des protéines plasmatiques. Il en résulte un gradient de pression osmotique et oncotique, généré par la différence entre le plasma et l'interstitium, ce même gradient s'opposant à l'entrée d'eau dans l'interstitium selon le gradient inverse de pression hydrostatique. Ceci a conduit à l'élaboration de différents solutés utilisables dans les situations de soins critiques. Dans cette section nous décrirons tout d'abord les principes électrochimiques régissant certaines propriétés des solutés avant de décrire les différents produits disponibles.

### 1.7.2. Équilibre acide-base : de la théorie à la pratique

Le milieu intérieur est finement régulé afin de maintenir le pH dans des valeurs extrêmement proches de 7,40. Plusieurs systèmes tampons permettent ceci : le  $\text{CO}_2$ , le  $\text{HCO}_3^-$  et différents autres tampons tels que l'albumine et les phosphates. Plusieurs modèles tentent d'expliquer le rôle de ces tampons et comment la variation de leur concentration permet de maintenir le pH dans des valeurs physiologiques. Le modèle le plus connu est celui d'Henderson-Hasselbach tel que :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$$

Dans ce modèle l'augmentation des ions  $\text{H}^+$  plasmatiques peut être compensée par une augmentation de la réabsorption de  $\text{HCO}_3^-$  au niveau rénal ou une diminution de la  $\text{PaCO}_2$  par hyperventilation. Se basant sur le principe d'électroneutralité du plasma, l'analyse des troubles acido-basiques peut dès lors être complétée par l'étude du trou anionique. Ainsi, la somme des cations équivalant à la somme des anions, la différence entre ceux couramment dosés est appelée « trou anionique » tel que :

$$\text{TA} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-) = 16 \pm 4 \text{ mmol/l}$$

Le calcul du TA permet ainsi de différencier une acidose par perte de bicarbonate (diarrhée, pertes rénales) d'une acidose secondaire à l'accumulation d'un acide faible (anion) non dosé couramment (lactates, corps cétoniques...) responsable de son augmentation. De même, une augmentation massive de la volémie par un soluté salé hyperchlorémique entraînerait une augmentation conjointe de chlore et de sodium mais une dilution des ions bicarbonates responsable d'une acidose métabolique sans augmentation du trou anionique. Ce modèle, bien que simple pour appréhender les variations de pH, n'explique qu'imparfaitement l'acidose

hyperchlorémique et ne prend pas en compte les autres tampons physiologiques de l'organisme, notamment les protéines. Dans les années 1980, Stewart développa un modèle basé sur 3 principes fondamentaux : l'existence d'une légère mais permanente dissociation de l'eau en ions  $H^+$  et  $OH^-$ , la loi de conservation des masses et l'électroneutralité du plasma<sup>214</sup>. Ainsi, le pH plasmatique dépend de trois variables indépendantes : la différence entre anions et cations forts, appelée le « strong ion difference » ou SID, la  $PaCO_2$  et la quantité d'acides faibles totaux  $Atot$  (albumine, phosphate, globuline) (figure 13) et de trois constantes :  $S$  la constante de solubilité du  $CO_2$  ( $S=0,0306$ ),  $K_1$  la constante de dissociation apparente du  $CO_2$  ( $pK_1=6,103$ ) et  $K_a$  la constante de dissociation effective des tampons non volatiles. Une manière simplifiée d'appréhender le modèle de Stewart consiste à le formuler mathématiquement tel que :

$$pH = pK_1 + \log\left[\frac{SID - Atot}{(1 + 10^{pK_a - pH})} / (S \times PaCO_2)\right]$$

où  $SID = 40 \pm 2 \text{ mEq/l}$

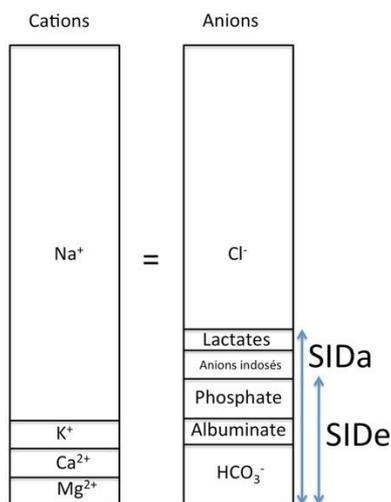
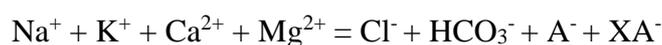


Figure 13 : représentation schématique du modèle de Stewart. La somme des cations et des anions est toujours équivalente dans le plasma. SID : *Strong Ion Difference* ; a : apparent ; e : effectif.

La démarche physiologique et mathématique aboutissant à cette équation simplifiée peut être approfondie par la lecture de la très bonne revue écrite par HE Corey<sup>215</sup>.

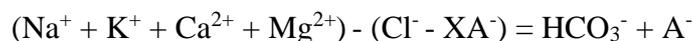
Ainsi, une diminution du SID sera associée à une acidose tandis qu'une diminution des acides faibles tendra vers l'alcalose métabolique. Par définition, le SID d'une solution salée à 0,9% est de 0 mEq/l. Le SID du plasma étant d'environ 40 mEq/L, son administration en grande quantité sera donc responsable d'une acidose métabolique avec hyperchlorémie par diminution du SID. A contrario, l'utilisation d'un soluté présentant un SID physiologique de 40 mEq/l ne suffirait pas à maintenir un équilibre acido-basique normal du fait de la dilution des acides faibles  $Atot$  et induirait donc une alcalose. L'utilisation de solutés présentant un SID de 24 mEq/l semble un équilibre acceptable<sup>216</sup>.

Une autre information donnée par la théorie de Starling est la *Strong Ion Gap* (SIG). En effet, en raison de l'électroneutralité du plasma, nous pouvons formuler l'équation :



Où A<sup>-</sup> acides faibles et XA<sup>-</sup> anions indosés

Devenant après réarrangement



La partie gauche de l'équation peut être simplifiée au SID dit apparent (SIDa) où XA<sup>-</sup> est alors réduit au seul lactate. Dans ce cas l'équation ne prend pas en compte certains anions. La partie droite est appelée SID effectif (SIDE) et prend en compte les acides faibles tel que A<sup>-</sup> = albuminates + phosphates. A l'état normal, la différence entre les SIDa et SIDE, ou SIG, est nulle. Tout comme dans le calcul du trou anionique, une augmentation du SIG peut correspondre à une accumulation d'anions indosés.

Dans l'idéal un soluté d'EV devrait permettre une restauration de la volémie efficace sans augmenter la fuite capillaire vers le secteur interstitiel, sans effet secondaire métabolique et à moindre coût. Actuellement les solutés disponibles sont classés en cristalloïdes (contenant de l'eau et des ions) ou colloïdes (contenant de l'eau, des ions et des macromolécules). En fonction de leur composition ionique ils sont également classés en balancés et non balancés.

### 1.7.3. Les cristalloïdes

Les principales caractéristiques physico-chimiques des cristalloïdes courants sont présentées dans le tableau 2. Conformément au modèle de Starling évoqué précédemment, tous les cristalloïdes présentent une durée d'action limitée d'environ 1 à 2 h, temps nécessaire à l'équilibration des volumes de part et d'autre de la membrane capillaire. Le pouvoir d'expansion est de l'ordre de 20% du volume perfusé nécessitant la perfusion de volume parfois important pour restaurer une volémie efficace pouvant donc exposer au risque de fuite capillaire importante, à une hypothermie en cas d'administration de produits non réchauffés et à des troubles de dilution du milieu intérieur<sup>217</sup>. Le rendement volémique peut toutefois être meilleur dans les situations d'hypovolémie comme démontré lors d'administration de ringer-acétate après séquestration sanguine chez des volontaires sains<sup>218</sup>. Ce principe est transposable à toute situation d'hypovolémie, où dès lors la pharmacocinétique des cristalloïdes se rapproche d'un pouvoir d'expansion volémique de 100%, puisqu'il a pour objectif la compensation du volume sanguin efficace perdu.

<b>Composition</b>	<b>Plasma</b>	<b>NaCl 0,9%</b>	<b>Ringer Lactate</b>	<b>Isofundine®</b>	<b>Plasmalyte®</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	140	154	130	145	140
<b>K<sup>+</sup></b>	4	0	5,4	4	5
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	1	0	0	1	1,5
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	2,2	0	1,8	2,5	0
<b>Cl<sup>-</sup></b>	100	154	111	127	98
<b>lactates</b>	1	0	27,7	0	0
<b>Malate</b>	0	0	0	5	
<b>Acétate</b>	0	0	0	24	27
<b>Pyruvate</b>	0	0	0	0	0
<b>Gluconate</b>	0	0	0	0	23
<b>Osmolarité</b>	285	308	276,8	309	295
<b>pH</b>	7,40	4,5-7	6-7,5	5,1-5,9	6,5-8
<b>SID <i>in vivo</i></b>	40	0	28	29	50

Tableau 1 : composition des principaux solutés cristalloïdes disponibles en France, exprimée en mmol/l sauf pour SID en mEq/l et osmolarité en mosm/l.

#### 1.7.3.1. Serum salé à 0,9%

Parmi les cristalloïdes, le NaCl 0,9% est probablement encore le soluté le plus utilisé. Il est constitué d'eau, de 154 mmol/L de sodium et de 154 mmol/L de chlore. Il présente donc *in vivo* un SID nul, responsable d'une acidification du milieu intérieur, et une charge chlorée élevée pouvant induire des effets secondaires sur la fonction rénale et l'inflammation comme nous le verrons plus tard.

#### 1.7.3.2. Cristalloïdes balancés

Les solutés dits balancés présentent une charge en chlore réduite. L'électroneutralité de la solution est assurée par la présence d'un anion organique métabolisable. Leur SID *in vitro* est de 0 mEq/L (il y a autant de cations que d'anions dans la solution), mais la métabolisation très rapide de l'anion organique est responsable d'un SID *in vivo* du soluté autour de 30 mEq/L. Sont actuellement disponibles en France les

solutés de Ringer-Lactate (RL, contenant du lactate), de malate-acétate (Isfundine® IF, B Braun) et de gluconate-acétate (Plasmalyte® PL, Baxter).

#### 1.7.3.2.1. Ringer lactate

La composition exacte du RL varie d'une préparation à l'autre mais reste proche de celle du plasma avec une charge chlorée réduite par rapport au NaCl 0,9%. Son SID est de 28 mEq/L. La réduction de la charge chlorée est permise par la présence de lactate qui est rapidement métabolisé, principalement par le foie et le rein. Son osmolarité, de 276 mosm/L *in vitro*, est plus faible encore *in vivo*, pouvant atteindre les 250 mosm/L et le contre indique théoriquement en cas de traumatisme cérébral. Les conséquences sur l'osmolalité plasmatique restent malgré tout probablement faibles. En effet, l'administration de 50 mL/kg chez des volontaires sains induisait une diminution de seulement 4±3 mosm/kg, réversible en 1 heure<sup>219</sup>. De même, son utilisation (20mL/kg/h) lors de chirurgie rachidienne majeure en comparaison au NaCl 0,9% chez 30 patients induisait uniquement une baisse modérée de la natrémie (136±4 mmol/L versus 143 ±4 mmol/L) 6 heures après la chirurgie, réversible sous 6 heures<sup>220</sup>. Une augmentation modeste de la PaCO<sub>2</sub> était également observée, probablement en rapport avec la métabolisation hépatique du lactate en bicarbonate, mais avec un maintien du pH dans des valeurs plus physiologiques que dans le groupe NaCl 0,9%. Enfin, malgré la présence de potassium il n'existe pas de risque surajouté d'hyperkaliémie avec son administration. En effet, dans une étude randomisée en double aveugle portant sur 51 patients, son administration au cours de transplantations rénales en comparaison avec du NaCl 0,9% induisait moins d'hyperkaliémie et d'acidose métabolique<sup>221</sup>.

#### 1.7.3.2.2. Malate acétate et gluconate acétate

De même que le RL, leur composition approche celle du plasma. L'électroneutralité est cette fois assurée par de l'acétate et du malate ou du gluconate. Il est probable que la plus grande partie du malate et de l'acétate perfusés intègre le cycle de Krebs en étant transformé en oxalocétate par la malate deshydrogénase pour le malate ou en participant à la formation d'acetyl-CoA pour l'acétate. Le gluconate est lui éliminé par voie rénale sous forme inchangée à hauteur de 60 à 85%. Malgré un SID théorique de 50 mEq/L, l'utilisation du gluconate-acétate en pratique courante ne se traduit pas par une alcalose métabolique<sup>222,223</sup> et son administration chez des patients bénéficiant d'une transplantation rénale provoquait moins d'hyperkaliémie et moins d'hyperchlorémie que le NaCl 0,9%<sup>224</sup>.

#### 1.7.3.2.3. Impact clinique des solutés balancés

##### 1.7.3.2.3.1. Impact sur la fonction rénale

Les solutés riches en chlore tels que le NaCl 0,9% pourraient présenter une toxicité par vasoconstriction artériolaire rénale secondaire à l'augmentation de la réabsorption tubulaire du chlore. La quantité plus

importante de chlore délivrée à la *macula densa* activerait le feedback tubulo-glomérulaire, un processus physiologique régulant le débit de filtration glomérulaire et impliquant l'angiotensine-2<sup>225-227</sup>. Ce feedback déclenche la vasoconstriction de l'artériole afférente, la contraction du mésangium et donc la diminution de la filtration glomérulaire. Dans une étude randomisée contrôlée, la perfusion de 2 litres de NaCl 0.9% chez des volontaires sains provoquait une diminution significative des vélocités sanguines mesurées dans l'artère rénale et de la perfusion tissulaire corticale par rapport à ceux qui avaient reçu du Plasmalyte<sup>®228</sup>. Enfin, la charge chlorée pourrait favoriser la libération de thromboxane, ayant un effet vasoconstricteur.

Plusieurs études ont ainsi exploré l'impact du NaCl 0,9% versus d'autres solutés balancés sur la fonction rénale. Dans une étude de cohorte avant-après portant sur 1533 patients de réanimation non sélectionnés (moins de 10 % de sepsis), 760 patients ont reçu des solutés de perfusion selon les habitudes du service pendant la période contrôle de 6 mois, essentiellement des solutés riches en chlore (NaCl 0.9%, gélatines, albumine 0.4%). Après une période dite de formation sur les solutés balancés, 773 patients ont reçu des solutés pauvres en chlore sur 6 mois (période interventionnelle). En comparant ces deux périodes, l'augmentation de la créatininémie moyenne pendant le séjour en réanimation était respectivement de 22,6  $\mu\text{mol/l}$  versus 14,8  $\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0,03$ ). L'incidence des insuffisances rénales aiguës de type « injury » et « failure » définies selon la classification RIFLE a diminué de 14 à 8,4%, ( $p < 0,001$ ) et la nécessité du recours à une épuration extra-rénale a diminué de 10 à 6,3% en faveur des solutés balancés<sup>229</sup>. Dans une étude de cohorte, Sen *et al* mirent en évidence une corrélation entre la charge chlorée et l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë et la mortalité chez 4710 patients de réanimation nécessitant une expansion massive dans les 24 premières heures ( $> 60 \text{ mL/kg}$ )<sup>230</sup>. Selmer *et al* ne mirent pas en évidence de différence sur l'agression rénale chez 974 patients de réanimation entre NaCl 0,9% et solutés balancés<sup>231</sup>. Ces mêmes auteurs randomisèrent par la suite 15 802 patients admis en réanimation entre NaCl 0,9% et solutés balancés. L'utilisation de NaCl 0,9% était associée à un risque majoré d'évènements rénaux majeurs (décès, épuration extra-rénale, insuffisance rénale persistante). L'analyse en sous-groupe des 15% de patients septiques objectivait un bénéfice plus important des solutés balancés dans ce groupe (OR 0,8 [0,67-0,94])<sup>232</sup>. De même, dans une étude parallèle à cette dernière, les auteurs randomisèrent 13 347 patients admis au service d'accueil des urgences, et ensuite hospitalisés en service conventionnelle, entre solutés balancés et non balancés. Ils observèrent également une diminution des évènements rénaux majeurs avec les solutés balancés (OR 0,82 [0,70-0,95])<sup>233</sup>.

#### 1.7.3.2.3.2. Impact sur l'équilibre acido-basique

Les résultats sont conséquents sur l'équilibre acido-basique avec une acidose hyperchlorémique fréquente chez les patients ayant reçu du NaCl 0,9% lors de différentes situations : contexte péri-opératoire, transplantation rénale, rhabdomyolyse<sup>234-238</sup>. Ces études ont montré une diminution du taux plasmatique de bicarbonate, du SID et du pH associée à une augmentation de la chlorémie. Une acidose hyperchlorémique

compliquée d'acidémie peut survenir lorsqu'une quantité importante de NaCl 0,9% (20 mL/kg/h) est perfusée sur une courte durée, et se corrige spontanément en quelques heures. Les conséquences cliniques de ce déséquilibre acido-basique sont discutables. Néanmoins, il est licite d'émettre l'hypothèse qu'une acidose hyperchlorémique acquise dans un contexte d'agression majeure ou d'acidose sévère préexistante (acidocétose diabétique, état de choc) puisse être un facteur aggravant. Dans des modèles animaux de choc septique, l'instauration d'une acidose hyperchlorémique augmentait le processus inflammatoire et réduisait la survie des animaux<sup>239-241</sup>. Malheureusement, aucune étude prospective de méthodologie satisfaisante n'a évalué spécifiquement les conséquences de l'acidose hyperchlorémique, avec ou sans acidémie, chez des patients de réanimation. Une étude rétrospective portant sur 3116 patients présentant un SIRS, post-opératoire ou non, comparait les patients ayant reçu au moins 500 ml de NaCl 0,9% et ceux ayant reçu au moins 500 ml de solutions balancées. Les patients du groupe NaCl 0,9% présentaient plus fréquemment une acidose hyperchlorémique, une mortalité plus importante (3,27 versus 1,03%,  $p < 0,001$ ) et plus de dysfonctions d'organes<sup>242</sup>. Dans le contexte d'acidocétose diabétique, une première étude randomisée contrôlée a montré qu'une réhydratation par gluconate-acétate était associée à une chlorémie plus basse et à un taux de bicarbonate plus élevé comparativement à une réhydratation par NaCl 0,9%<sup>237</sup>. Pour finir, dans une méta-analyse portant sur 9 études randomisées et 871 patients chirurgicaux, l'utilisation per-opératoire de NaCl 0,9% était associée à une diminution du pH et du *base excess*<sup>243</sup>.

#### 1.7.3.2.3.3. Impact sur la coagulation

Les effets sur la coagulation ont été étudiés dans un certain nombre d'indications : contexte péri-opératoire, transplantations hépatiques et rénales, chirurgies gynécologiques, pancréatiques et hépato-biliaires. Il semble que les saignements et les besoins transfusionnels soient équivalents chez les patients traités par NaCl 0,9% et ceux traités par Ringer lactate. Ce résultat pourrait être différent dans les populations à haut risque hémorragique. Dans une étude randomisée, en double aveugle, concernant des patients bénéficiant d'une chirurgie d'un anévrisme de l'aorte abdominale, les besoins transfusionnels étaient significativement plus importants dans le groupe « NaCl 0,9% » que dans le groupe « Ringer lactate »<sup>244</sup>. Cette tendance à un risque de saignements plus importants chez les patients à haut risque hémorragique semble se confirmer dans une méta-analyse<sup>245</sup>.

#### 1.7.3.2.3.4. Impact sur le processus inflammatoire

Une notion moins connue est l'effet potentiellement bénéfique des solutés balancés sur l'inflammation. Des études mirent en évidence une réduction du processus inflammatoire chez des patients admis pour pancréatite aiguë recevant du Ringer lactate versus NaCl 0,9%<sup>246,247</sup>. Dans un modèle *in vitro* de macrophages

stimulés au LPS, il a été montré une augmentation du facteur de transcription NF-κB dans les cellules soumises à une acidose hyperchlorémique<sup>248</sup>.

Au total, le NaCl 0,9% est un soluté riche en chlore et donc à risque de lésion rénale dès lors que les volumes utilisés sont significatifs (dès 500 mL par jour)<sup>249</sup>. L'utilisation de solutés pauvres en chlore, dits balancés, paraît donc licite afin de réduire l'impact sur la morbi-mortalité, à un coût raisonnable.

#### 1.7.4. Les colloïdes

Les colloïdes sont des solutés d'expansion volémique riches en molécules de haut poids moléculaire, et donc en théorie ne diffusant que peu à travers la barrière endothéliale. Ils seraient ainsi censés limiter la fuite de volume vers l'interstitium afin d'améliorer le pouvoir d'expansion volémique tout en limitant l'œdème tissulaire. Les hydroxyethyl amidons (HEA) sont des solutés d'expansion volémique composés d'eau, d'ions et de macromolécules de haut poids moléculaire à base de sucres complexes. Plus le poids moléculaire est élevé et plus la pression oncotique, et donc le pouvoir d'expansion volémique, sont élevés. Les HEA récents sont obtenus après modification d'un polymère de glucose naturel provenant du maïs (Voluven<sup>®</sup>) ou de la pomme de terre (Restorvol<sup>®</sup>) : l'amylopectine. Afin de limiter la dégradation de ce sucre par l'amylase plasmatique, la molécule d'HEA présente une hydroxylation sur certaines molécules de glucose, diminuant ainsi l'accessibilité de l'HEA à l'enzyme. Ainsi plus le taux de substitution est élevé, plus l'effet est prolongé. Ces solutés présentent donc théoriquement un effet supérieur aux solutés cristalloïdes. Cependant plusieurs études récentes ont mis en évidence une association entre utilisation d'HEA et morbi-mortalité en réanimation, notamment lors du sepsis. Dans l'étude CHEST, Myburgh *et al* randomisèrent 7000 patients de réanimation entre Voluven<sup>®</sup> et NaCl 0,9%. L'utilisation de Voluven<sup>®</sup> était associée à une augmentation de l'incidence d'insuffisance rénale aiguë et à plus d'effets indésirables (prurit, rash cutané, autres)<sup>250</sup>. Dans l'étude 6S, Perner *et al* randomisèrent 800 patients septiques entre Voluven<sup>®</sup> et ringer acétate. L'utilisation d'HEA était associée à une augmentation de la mortalité, de l'incidence d'insuffisance rénale aiguë et de saignement majeur<sup>251</sup>. Les HEA induisent en effet un certain nombre d'effets secondaires :

- Insuffisance rénale par vacuolisation tubulaire rénale, lésion oncotique intra-glomérulaire, augmentation de la viscosité urinaire
- Altération de l'hémostase avec diminution du facteur von Willebrandt, diminution du facteur VIII, diminution de la polymérisation de la fibrine
- Réaction anaphylactique

Ces effets secondaires et les études au cours du sepsis ont conduit à la non recommandation d'utilisation de ce soluté lors du sepsis par les sociétés savantes<sup>180</sup> et le retrait de l'autorisation de la mise sur le marché dans cette indication par la Haute Autorité de Santé, cantonnant son utilisation aux hémorragies sévères

résistantes aux cristalloïdes<sup>252</sup>. Plus récemment, Futier *et al.* randomisèrent Voluven® et NaCl 0,9% pour la gestion hémodynamique péri-opératoire de patients bénéficiant de chirurgies majeures. Parmi les 775 patients randomisés, aucune différence significative n'était retrouvée en termes de mortalité ou de complications post-opératoires<sup>253</sup>. Dans une méta-analyse portant sur 55 essais cliniques et 27 000 patients, les patients bénéficiant d'HEA présentaient un risque majoré de mortalité à 90 jours<sup>254</sup> tandis qu'une autre méta-analyse sur 30 000 patients identifiait l'utilisation d'HEA comme facteur de risque de transfusion et d'épuration extra rénale<sup>255</sup>, rendant même discutable leur utilisation hors sepsis. Les autres colloïdes disponibles en France sont la gélofusine et l'albumine. Aucune étude à ce jour n'a démontré d'effet bénéfique à leur utilisation, limitant donc également l'intérêt de leur utilisation pour le moment<sup>255,256</sup>.

En dehors de ces effets indésirables, l'intérêt pharmacodynamique de ces molécules est questionnable dans les situations septiques avec fuite capillaire. Car si l'intégrité de la barrière endothéliale est censée assurer le maintien de la molécule d'HEA dans la lumière vasculaire, la dégradation du glycocalyx et l'altération des jonctions intercellulaires, comme exposé précédemment, ne garantissent plus cette séquestration intravasculaire, exposant la molécule à une diffusion vers l'interstitium et donc à un effet inverse de celui escompté. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion coronaire chez le cochon, avec en sus une altération du glycocalyx par des héparanases, Rehm *et al* ont démontré que tous les colloïdes (HEA et albumine) diffusaient de façon similaire aux cristalloïdes à travers les vaisseaux, réduisant de ce fait l'intérêt pharmacodynamique de ces molécules<sup>118</sup>. Ceci peut également être indirectement appréhendé dans l'étude 6S portant sur des patients sévères en sepsis (84 % de choc septiques, IGS moyen à 50), où la quantité de fluides administrés pour la réanimation était identique entre le groupe HEA et le groupe cristalloïde<sup>251</sup>. Il en était de même dans l'étude FLASH avec une différence minimale de 250 mL d'apports sur les 24 premières heures après chirurgie abdominale majeure entre Voluven® et NaCl 0,9 (1250 vs 1500 mL, p=0.006)<sup>253</sup>.

Au total, il n'existe actuellement pas en pratique clinique de fluide idéal permettant une expansion volémique satisfaisante, avec des effets secondaires minimales et un coût raisonnable. Parmi l'existant, les cristalloïdes balancés semblent être le meilleur compromis.

### 1.7.5. Soluté de lactate de sodium molaire

#### 1.7.5.1. Métabolisme du lactate

Le lactate est un métabolite intermédiaire important situé au carrefour de plusieurs voies métaboliques. Il peut être produit par un grand nombre de cellules, résultant en une production horaire de l'ordre de 1 mmol/kg/h au repos. Cette production est contrebalancée par une élimination extrêmement efficace du compartiment sanguin, essentiellement grâce à la captation du lactate par des organes métaboliseurs, et *à minima* par son excrétion rénale<sup>257</sup>.

La production de lactate résulte principalement de la transformation cytosolique du pyruvate grâce à la pyruvate deshydrogenase selon la réaction :  $\text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{lactate} + \text{NAD}^+$ . Cette enzyme présente une activité basale intense, permettant de maintenir un taux cytosolique de pyruvate bas, avec un ratio lactate/pyruvate supérieur à 10 en situation normale. Le pyruvate provient essentiellement de la glycolyse dont il est le produit final, destiné ensuite à intégrer le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs permettant la production par oxydation d'environ 36 molécules d'ATP pour une molécule de pyruvate (figure 14). Ainsi toute accumulation de pyruvate dans le cytosol (excès de glycolyse, défaut du cycle de Krebs, inactivité de la pyruvate deshydrogénase) se traduit par une hyperlactatémie. Cette étape de transformation du pyruvate en lactate est d'ailleurs essentielle à la glycolyse puisqu'elle permet la régénération d'un  $\text{NAD}^+$  à partir du NADPH, accepteur d'électrons indispensable à l'activité de la phosphotriose deshydrogenase, une enzyme clé de la glycolyse.

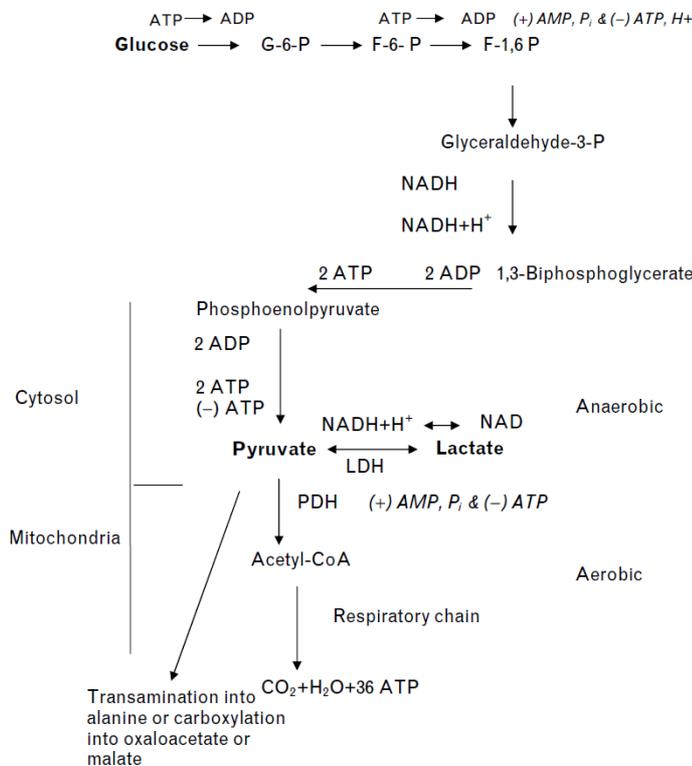


Figure 14 : représentation schématique du métabolisme du glucose. D'après Levy *et al* Curr Opin Crit Care 2006.

Le lactate ainsi produit dans les tissus à fort métabolisme glycolytique, comme le muscle, est ensuite transporté par voie sanguine jusqu'à des organes métaboliseurs. Ce processus, indispensable à la clairance plasmatique du lactate, est appelé « trafic » ou *shuttle* du lactate<sup>258</sup>. Ainsi le lactate peut être capté par le foie ou le rein afin d'être retransformé en glucose *via* la néoglucogenèse dans ce qui constitue le cycle de Cori<sup>259</sup>. L'autre voie de métabolisation du lactate est son oxydation mitochondriale grâce au cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. Le lactate est alors transformé en pyruvate puis métabolisé par le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie, lequel en collaboration avec la chaîne respiratoire va permettre la production d'énergie avec un rendement de l'ordre de 32 à 36 molécules d'ATP par molécule de lactate. Il est important de noter qu'en comparaison, la glycolyse ne produit au final que 4 molécules d'ATP par molécule de glucose. Le site

d'oxydation du lactate peut intervenir dans un organe distant de son site de production, toujours selon le concept du trafic du lactate. Ainsi par exemple le cerveau peut oxyder le lactate produit par le muscle. Cependant la théorie de la compartimentalisation énergétique myocytaire répond à la fois à l'augmentation de production de lactate par la cellule musculaire et l'augmentation de sa captation métabolique<sup>260</sup>. Ceci peut être expliqué par la présence au sein de la mitochondrie du complexe mLOC (*mitochondrial Lactate Oxidation Complex*). Le mLOC est composé d'une lactate déshydrogénase permettant la transformation du lactate en pyruvate après son transport dans la mitochondrie par un transporteur MCT (*monocarboxylate transport*). Ainsi cette oxydation se fait au sein de la mitochondrie, en dehors du cytosol, et permet à la fois la glycolyse avec transformation du pyruvate en lactate dans le cytosol (compartiment glycolytique), et à la fois l'oxydation du lactate par le cycle de Krebs dans la mitochondrie (compartiment oxydatif)<sup>261-264</sup> (figure 15).

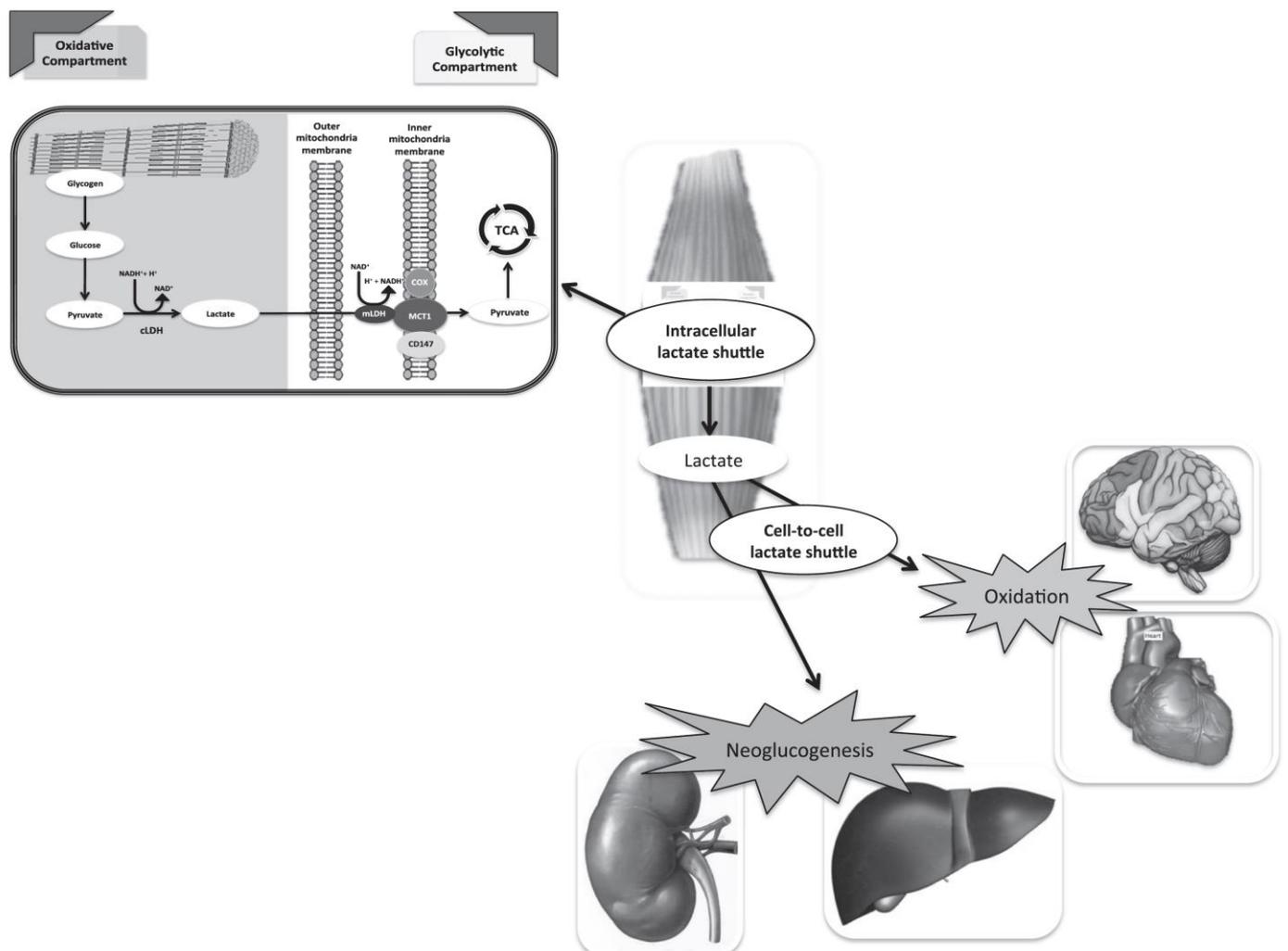


Figure 15 : représentation schématique du trafic du lactate. Le lactate produit par le muscle au cours de l'effort ou du stress peut être métabolisé à distance soit en glucose (foie, rein), soit oxydé par les organes à fortes dépenses énergétiques (cœur, cerveau), ou bien utilisé directement sur site par le muscle grâce à la « compartimentalisation » oxydative. D'après Garcia-Alvarez *Crit Care* 2014.

Le lactate constitue donc une source primordiale d'énergie pour de nombreux organes, notamment lors des situations de stress.

#### 1.7.5.2. Cœur et lactate

La captation et l'oxydation myocardique du lactate augmentent significativement au cours de l'exercice physique, mais également lors d'une élévation de la post-charge ou de la fréquence cardiaque suggérant un intérêt énergétique de ce métabolite en situation physiologique<sup>265,266</sup>. Au cours des états de choc, des données expérimentales suggèrent également un rôle essentiel du lactate dans le fonctionnement cardiovasculaire. Ainsi dans un modèle expérimental murin de choc hémorragique, la perfusion de lactate était associée à une meilleure performance cardiaque *ex vivo*<sup>267</sup>. Dans ce travail, l'activité pyruvate deshydrogenase était réduite de 20 à 30% et l'ajout de lactate n'augmentait pas la synthèse d'acetyl-CoA mais directement celle d'intermédiaires du cycle de Krebs comme le succinyl-CoA, suggérant que le lactate pouvait alimenter ce cycle indirectement. Les concentrations de lactate ajoutées dans ce modèle étaient de l'ordre de celles retrouvées dans le plasma de patients en états de choc, suggérant un mécanisme plutôt adaptatif que délétère de l'hyperlactatémie des patients critiques. De même, la privation de lactate, toujours dans un modèle de choc hémorragique, induisait une diminution du fonctionnement cardiaque<sup>268</sup>. Dans un modèle expérimental endotoxinique au LPS, Levy *et al* mirent en évidence que la privation en lactate par du dichloroacétate ou de l'ICI-118551 entraînait une diminution de la production tissulaire d'ATP associée à une diminution du débit cardiaque et de la pression artérielle, conduisant au décès des animaux<sup>269</sup>. La supplémentation par du lactate exogène abolissait ces effets négatifs, confirmant la place primordiale de ce substrat énergétique dans le fonctionnement cardiovasculaire des états de choc. Chez l'Homme, Nolas *et al* observèrent que l'administration de lactate de sodium chez le volontaire sain entraînait une amélioration de la fonction cardiaque par rapport à un soluté de chlorure de sodium de tonicité similaire, avec amélioration du pic systolique de l'anneau mitral à l'échocardiographie<sup>270</sup>. La même équipe avait également mis en évidence précédemment que l'administration de lactate de sodium semi-molaire chez des patients en insuffisance cardiaque aiguë était associée à un meilleur débit cardiaque et une meilleure fonction ventriculaire droite (TAPSE) par rapport à un soluté salé non hypertonique<sup>271</sup>. Il apparaît donc que le lactate est une source d'énergie importante pour le myocarde en condition physiologique, mais également lors de situations critiques où il pourrait alimenter le cycle de Krebs *via* plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est la conversion classique de lactate en pyruvate lui-même converti en acetyl-CoA et/ou en oxaloacétate. Le second est la production de corps cétoniques (3-hydroxybutyrate et d'acétoacétate), essentiellement par les hépatocytes, à partir de l'acetyl-CoA, dérivant lui-même de la décarboxylation oxydative du pyruvate par la pyruvate deshydrogénase ou de la  $\beta$ -oxydation des acides gras libres. Ceci est probablement particulièrement intéressant chez les patients critiques où un déficit en activité pyruvate deshydrogenase peut être observé<sup>272</sup>, les corps cétoniques étant alors retransformés en acetyl-CoA dans le myocarde et le cerveau pour alimenter le cycle de

Krebs. Plusieurs travaux ont en effet démontré que les patients en insuffisance cardiaque chronique présentaient une altération des voies énergétiques avec une *downregulation* de plusieurs enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras libres, responsable d'une diminution de ces substrats dans l'oxydation du cycle de Krebs. Les corps cétoniques, essentiellement de l'acétoacétate et du 3-hydroxybutyrate, devenaient alors une source énergétique importante, responsable de plus de 25% de la production d'ATP<sup>273</sup>. Un essai clinique récent a d'ailleurs démontré un impact positif sur la fonction cardiaque de l'utilisation de 3-hydroxybutyrate chez des patients insuffisants cardiaques chroniques, avec augmentation du débit cardiaque<sup>274</sup>.

Il apparaît donc que le lactate est un métabolite important pour l'homéostasie énergétique du myocarde à l'état physiologique tout comme chez les patients critiques et que sa métabolisation permet de pallier au déficit énergétique des patients les plus graves.

#### 1.7.5.3. Lactate et cerveau

Le lactate est également une source énergétique pour le cerveau. Il est produit par les astrocytes selon la voie glycolytique puis oxydé dans les neurones et peut représenter jusqu'à 25% de l'énergie nécessaire durant l'exercice physique<sup>264</sup>. Dans un modèle murin de traumatisme crânien, l'utilisation de soluté de lactate de sodium permettait une diminution de l'œdème cérébral (très probablement de par ses propriétés hypertoniques) mais également une amélioration de l'oxygénation tissulaire et surtout du ratio respiratoire mitochondrial<sup>275</sup>.

Le lactate semble donc bien être un substrat énergétique de premier ordre chez le patient critique, notamment dans le sepsis où la biodisponibilité énergétique peut faire défaut, avec à la fois une possible insulino-résistance pour certains tissus rendant l'utilisation périphérique du glucose difficile, une altération de l'oxydation des acides gras libres et un déficit en pyruvate deshydrogénase responsable d'une carence en acetyl-CoA. Le lactate est actuellement disponible sous forme d'un soluté de lactate de sodium molaire 11,2% produit par l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris.

#### 1.7.5.4. Lactate et l'inflammation

Le lactate de sodium 11,2% est un fluide hypertonique avec une osmolarité de 2000 mosmol/L. Il contient 23 g/L de sodium et 89 g/L de lactate et ne contient pas de chlore. Il répond donc à la définition d'un soluté balancé. L'équipe U995 *Lille Inflammation Research International Center* a exploré l'impact de ce soluté dans un modèle endotoxinique porcin. Les animaux étaient soumis à un stress endotoxinique par perfusion de LPS d'*Escherichia coli* puis les animaux étaient perfusés par un soluté de NaCl 0,9% (contrôle isotonique), de Bicarbonate de sodium 8,4% (contrôle hypertonique balancé, osmolarité 2000 mosmol/L) ou de lactate de sodium 11,2% pendant 5 heures. Le lactate de sodium était associé à une meilleure macro-hémodynamique

comparativement avec le NaCl 0,9%, avec un meilleur index cardiaque et une meilleure pression artérielle moyenne même si ces valeurs ne différaient pas du groupe bicarbonate de sodium. Par contre les paramètres micro-circulatoires étaient améliorés par le lactate de sodium versus le NaCl 0,9% mais également versus le bicarbonate de sodium hypertonique, avec une amélioration de la perfusion cutanée objectivée par laser avant et après occlusion hyperémique. La balance hydrique et l'hématose ( $PaO_2/FiO_2$ ) étaient également améliorées par le lactate de sodium comparativement aux deux autres groupes, suggérant fortement un effet bénéfique propre à ce soluté indépendamment de sa charge osmotique<sup>276</sup>. Il est important de noter que dans ce travail la glycémie des animaux traités par lactate de sodium était plus élevée, témoin de la métabolisation du lactate en glucose par néoglucogenèse. Dans un second travail, les mêmes auteurs réalisèrent le même modèle mais en supplémentant les groupes non-lactates par une quantité énergétique en glucose équivalente à celle fournie par le lactate (3,6 kcal/g). Ils observèrent toujours une amélioration de la balance hydrique, de l'hématose et de la microcirculation avec le lactate de sodium molaire versus NaCl 0,9% ou bicarbonate de sodium 8,4%, mais également une amélioration du transport en oxygène et du débit cardiaque. Ce travail suggérait une métabolisation rapide du lactate avec la formation précoce de pyruvate disponible pour l'oxydation dans le cycle de Krebs, illustrant bien la non équivalence des substrats énergétiques, puisque la perfusion de lactate aboutit à une production bien plus importante de pyruvate que celle d'une quantité calorique équivalente de glucose dans les autres groupes<sup>277</sup>. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les effets bénéfiques du lactate de sodium dans ce modèle. Comme nous l'avons vu précédemment, la molécule de lactate est utilisable par le cœur en situation de stress, soit par oxydation directe, soit *via* l'utilisation des corps cétoniques. Ainsi sa perfusion pourrait améliorer la performance cardiaque en situation inflammatoire bien que cela nécessite des investigations complémentaires. Ensuite, les effets bénéfiques sur la balance hydrique peuvent expliquer l'amélioration globale des différentes fonctions (cœur, poumons, rein) comme nous l'avons évoqué précédemment. En revanche les mécanismes sous-tendant l'amélioration de la balance hydrique par le lactate de sodium ne sont pas éclaircis à ce jour. Il apparaît néanmoins que la seule tonicité du soluté ne soit pas responsable de l'ensemble des effets bénéfiques du lactate de sodium, puisque sa perfusion faisait mieux que celle du contrôle hypertonique par bicarbonate de sodium 8,4%. Dans une étude prospective randomisée chez 50 patients pédiatriques atteints de Dengue, l'administration de lactate de sodium 11,2% (5 mL/kg) versus Ringer Lactate (20 mL/kg) était associée à une accumulation moindre de fluides et une diminution modeste du marqueur d'activation endothéliale sVCAM-1, suggérant un effet bénéfique sur l'endothélium. Si une amélioration de la fonction endothéliale, comme suggérée par ce travail, pourrait expliquer la diminution de la balance hydrique observée dans le modèle endotoxinique, le mécanisme sous-jacent n'est pas établi. La régulation du processus inflammatoire par le lactate pourrait être une hypothèse. En effet dans une étude ancillaire, Duburcq *et al*, toujours dans leur modèle porcin endotoxinique, mirent en évidence une diminution des taux d'IL-6, mais pas de TNF $\alpha$ , par l'administration de lactate<sup>278</sup>. En dehors de ses propriétés métaboliques,

le lactate présente un récepteur transmembranaire spécifique, le gpr81 ou *Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1* responsable de la transduction cellulaire. La liaison lactate/gpr81 permet notamment le recrutement de la molécule ARRB2, responsable de l'inhibition du complexe protéique NLRP3 de l'inflammasome, réduisant l'activation NF- $\kappa$ B et la production d'IL-1 $\beta$ <sup>279</sup>. Ainsi dans un modèle de pancréatite chez la souris, l'administration de lactate réduisait ce processus inflammatoire mais nécessitait son récepteur gpr81 pour exercer cet effet protecteur, témoin de la transduction cellulaire du lactate dans l'inflammation systémique<sup>279</sup>. Il existerait deux voies principales de régulation de l'inflammation par le lactate. Une voie extracellulaire que nous venons de décrire impliquant le récepteur membranaire gpr81 captant le lactate extracellulaire, et une voie intracellulaire impliquant soit le lactate venant de la glycolyse cytoplasmique, soit le lactate diffusant dans la cellule par les récepteurs spécifiques des carbohydrates MCT. Dans cette dernière voie, le lactate intracytosolique pourrait favoriser l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages, les orientant vers un profil anti-inflammatoire<sup>280</sup> (figure 16).

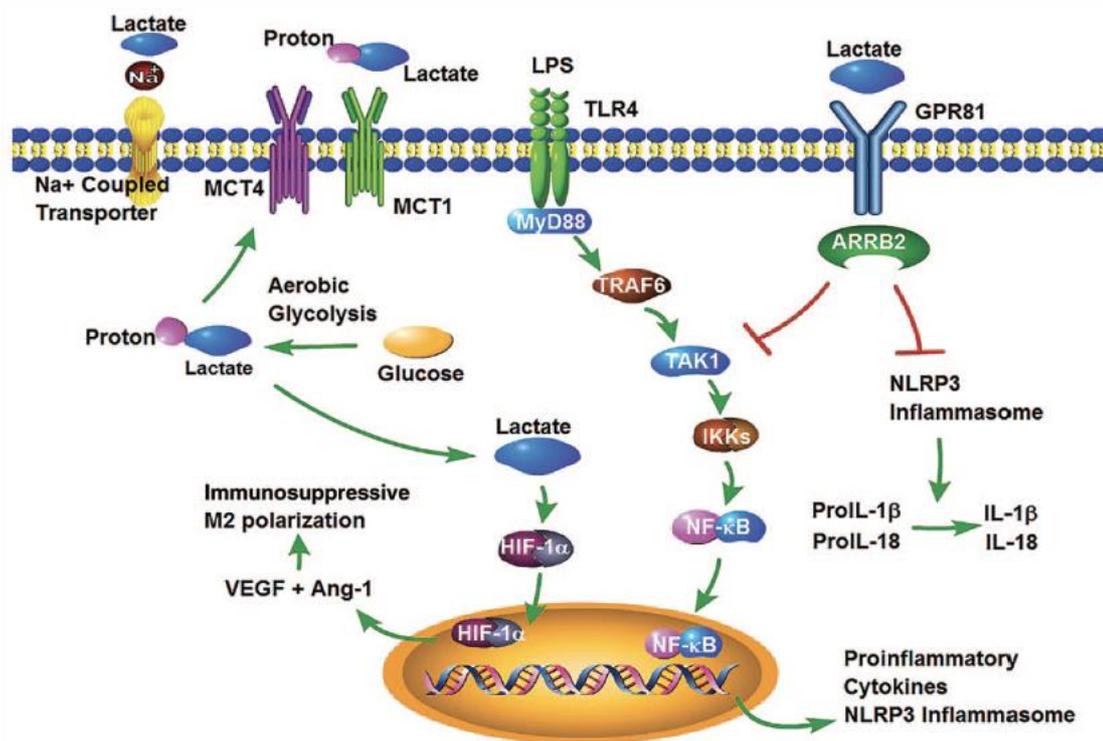


Figure 16 : place du lactate dans le profil inflammatoire des macrophages. D'après Nolt *et al* Shock 2018.

Ainsi, il est probable que les effets du lactate de sodium sur le syndrome œdémateux soient dus au moins en partie à la fois à l'effet osmotique du soluté et à la réduction de processus inflammatoire. Nous ne pouvons néanmoins écarter d'autres effets sur les voies régulant la perméabilité capillaire (cf supra).

Toutes ces données proviennent d'expérimentation soit *in vitro*, soit d'un modèle endotoxinique présentant de nombreuses limites : activation unique de la voie TLR-4, clairance élevée de l'endotoxine, stress intense d'emblée [...] avec une transposition faible au sepsis rencontré chez l'homme. A l'inverse, Su *et al* observèrent, dans un modèle de péritonite ovin, des effets délétères du lactate de sodium semi-molaire en comparaison à divers solutés (Ringer lactate, NaCl 0,9%, NaCl 3%), avec une défaillance multi-viscérale apparaissant dès 12 heures après le début du choc, associant hypoxémie, insuffisance circulatoire et altération de la micro-circulation conduisant au décès. Seule la balance hydrique était très légèrement améliorée par le lactate de sodium molaire, mais de façon comparable au NaCl hypertonique<sup>281</sup>. La première limite de ce travail est l'utilisation d'un modèle ovin de sepsis, dont la transposition à l'Homme est souvent limitée, moins bien étudié que les modèles murins ou même porcins. Une deuxième limite est la présence de différences entre les groupes dans la gestion hémodynamique avec une administration de 30% de fluides en moins dans le groupe lactate versus NaCl 0,3%. Mais la principale interrogation face à ce travail est la métabolisation effective du lactate. En effet, et de façon surprenante, la glycémie des animaux perfusés par du lactate était strictement superposable à celle des autres groupes alors même que leur lactatémie était élevée comme attendu. De plus les ratios lactate/pyruvate tissulaires étaient très significativement augmentés dans le groupe lactate, suggérant l'absence de transformation du lactate en pyruvate, contrairement à ce qui était observé dans les travaux de Duburcq *et al*. Il est donc probable que le lactate perfusé n'ait pas participé ni à la néoglucogenèse du cycle de Cori ni à l'oxydation phosphorylative. Ainsi les résultats de cette étude peuvent difficilement être opposés à ceux des études précédentes que ce soit dans les modèles endotoxiniques, chez l'insuffisant cardiaque ou lors de la Dengue (études toutes positives), sans réalisation d'étude infirmant ou confirmant ces résultats.

Il nous apparaît donc que le lactate de sodium molaire puisse être un fluide potentiellement d'intérêt dans les situations critiques inflammatoires, notamment par ses effets métaboliques et ses effets sur la balance hydrique. Il reste néanmoins beaucoup d'interrogations sur ses mécanismes d'action devant être mieux compris avant d'envisager sa place dans l'arsenal thérapeutique du sepsis. Cette étude a fait l'objet de la troisième partie de ce doctorat.

## 2. Objectifs des travaux de recherche

L'objectif principal de ce doctorat était d'évaluer de nouvelles cibles thérapeutiques sur la perméabilité capillaire au cours des situations inflammatoires aiguës en situation clinique et/ou expérimental.

A cette fin, nous avons divisé le travail en 3 parties distinctes :

- Une première partie dans laquelle nous nous sommes efforcés d'identifier les effets de la balance hydrique sur la mortalité de patients traités par ECMO veino-artérielle pour choc cardiogénique réfractaire, population présentant certaines similitudes physiopathologiques avec le sepsis quant au profil inflammatoire et à la dysfonction endothéliale. Cette partie a pour originalité de se concentrer sur une population peu étudiée mais qui pourrait aussi bénéficier de thérapies innovantes sur cette thématique.
- Les deuxième et troisième parties explorent des axes thérapeutiques sur la fonction endothéliale, et tout particulièrement sur la propriété « barrière », au cours de modèles de choc septique :
  - Deuxième partie : nous avons exploré les effets de l'anticorps anti-VEGF bevacizumab dans un modèle murin de choc septique.
  - Troisième partie : nous avons exploré les effets de l'administration de lactate de sodium molaire dans un modèle murin de choc septique.

### 3. Résultats

#### 3.1. Partie 1 : effets de la balance hydrique au cours du choc cardiogénique réfractaire traité par ECMO veino-artérielle

##### Résumé

Ce travail a été publié dans la revue *Shock*<sup>282</sup>

Besnier E, Boubèche S, Clavier T *et al* Early positive fluid balance is associated with mortality in patients treated with veno-arterial extra corporeal membrane oxygenation for cardiogenic shock: a retrospective cohort study. *Shock* 2019. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001381

##### Rationnel :

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de la balance hydrique sur les 5 premiers jours après l'implantation d'une assistance circulatoire par ECMO veino-artérielle dans une population de patients en choc cardiogénique réfractaire toutes étiologies confondues, et sur une période de 3 ans. L'objectif principal était l'association entre la balance hydrique à J1 et la mortalité. Les objectifs secondaires étaient l'association entre mortalité et balance hydrique aux autres temps, la balance hydrique cumulative sur 5 jours, et la prise de poids quotidienne. Ont été exclus les patients décédant dans les 12 premières heures (n=38), les femmes enceintes (n=4), les chocs septiques (n=5), les patients mineurs (n=8) et les dossiers incomplets (n=14), aboutissant à l'analyse de 101 patients.

##### Résultats :

La mortalité était de 47 % avec une médiane de survie à 4 [3-9] jours et 60% des décès survenaient dans les 5 premiers jours. Les caractéristiques démographiques étaient globalement identiques entre les non-survivants et les survivants, hormis une plus grande proportion d'arrêt cardiaque réfractaire chez les non-survivants et des scores de gravité plus importants (IGS-2 : 71 [55-89] vs 60 [47-70], p=0.0008). Les balances hydriques à J1 et J2 étaient significativement plus élevées chez les non-survivants (47.3 [18.1-71.9] vs 19.3 [1.5-36.2] mL/kg, p<0.0001 et 30.6 [14.8-71.0] vs 10.1 [-9.8-34.7], p=0.025). La balance hydrique cumulée augmentait progressivement chaque jour atteignant 107.3 [40.5-146-.2] vs 53.0 [7.5-74.4] mL/kg à J5 (p=0.038). Cette différence d'accumulation de fluides était secondaire à des apports hydriques plus importants chez les non-survivants à J2 (67 [47-102] vs 49 [35-73] mL/kg, p=0.045). L'étude de la prise de poids comme facteur d'évaluation de la balance hydrique était décevante, avec une corrélation existante mais de force modérée à faible, (r=0.36 à 0.50 selon les jours). Après ajustement sur l'indication de l'ECMO, l'âge, le sexe, le score IGS-2 et l'année d'implantation de l'ECMO, la réalisation d'une régression logistique observait une association significative et indépendante de la balance hydrique positive à J1 avec la mortalité à 28 jours. De plus, la réalisation d'un modèle de Cox montrait une

association indépendante entre balance hydrique positive à J1 et à J2 avec le délai au décès, confirmant l'analyse multivariée. Enfin, la balance hydrique à J1 prédisait la mortalité avec une aire sous la courbe de 0.749 et une valeur de 38.8 mL/kg présentait une spécificité de 83% et une sensibilité de 60%.

#### Conclusion :

Ce travail confirme l'importance de l'accumulation de fluides tissulaires et du syndrome œdémateux dans le pronostic des patients de réanimation, hors sepsis. Les perspectives thérapeutiques que nous développerons par la suite pour les patients septiques pourront donc également être étudiées dans cette population de patient.

### 3.2. Partie 2 : intérêt du bevacizumab, anti-corps anti-VEGF, dans le sepsis

#### Résumé

Ce travail a été publié sous forme de lettre à l'éditeur dans la revue *Critical Care*<sup>283</sup>

Besnier E, Brakenhielm E, Richard V, Tamion F. Does anti-VEGF bevacizumab improve survival in experimental sepsis? *Crit Care* 2017; 21:163. DOI: 10.1186/s13054-017-1734-x

#### Rationnel :

Nous avons élaboré ce travail suite à la publication de Jeong *et al* parue dans *Critical Care* en 2013<sup>176</sup>. Dans ce travail, les auteurs étudièrent les effets du bevacizumab, anticorps humanisé anti-VEGF, dans divers modèles de sepsis (cultures cellulaires, LPS, ponction ligature caecale, cf chapitre dédié de l'introduction). Dans ce travail, les auteurs mirent en évidence que le traitement par bevacizumab diminuait l'expression génique et protéique des marqueurs pro-inflammatoires (IL-6, RANTES, MCP-1) *in vitro*. L'utilisation de bevacizumab à la dose de 0,1 mg/kg par voie intrapéritonéale était associée à une amélioration de la survie des souris exposées au LPS ou à une péritonite polymicrobienne par ligature et ponction caecale. Ceci était observé soit en pré-traitement par le bevacizumab (1 heure avant le sepsis) ou en post-traitement (6 heures après l'initiation du sepsis). Aucun bénéfice sur la survie n'était observé pour la dose de 1 mg/kg ou pour un post traitement au-delà de la 6<sup>ème</sup> heure. De plus il était démontré une diminution de la perméabilité capillaire dans le modèle LPS, objectivée par la mesure de la diffusion du marqueur colorimétrique de bleu d'Evans. Ce marqueur est largement utilisé pour étudier la perméabilité depuis le secteur vasculaire vers l'interstitium. Après injection intraveineuse ce colorant se fixe sur les protéines circulantes, essentiellement l'albumine. Sa mesure dans les tissus, après soustraction du volume sanguin circulant, est donc un reflet de diffusion protéique trans-endothéliale.

Devant les résultats de cette étude, nous avons entrepris d'explorer plus avant les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques du bevacizumab lors du sepsis, notamment sur les voies impliquant jonctions intercellulaires et VEGF. Nous avons tout d'abord entrepris de reproduire les résultats de Jeong *et al* concernant la survie dans un modèle murin de sepsis. Trente souris C57Bl/6 furent randomisées pour recevoir soit du NaCl 0,9% soit du bevacizumab 0,5 mg/kg (Avastin<sup>®</sup>, Roche, France) (n=15/groupe) immédiatement avant la réalisation d'un sepsis par ponction ligature caecale avec perforation transfixiante par une aiguille 21G. Les animaux recevaient en fin d'intervention une administration sous-cutanée d'ofloxacine (30 mg/kg), de tramadol (40 mg/kg) et de NaCl (30 mL/kg). La survie était observée pendant 10 jours et comparée entre les groupes par un test du Log-rank.

## Résultats :

Aucune différence entre les groupes n'était observée (36 vs 27%,  $p=0,64$ ). Afin de s'assurer que la voie d'administration intra-péritonéale ne soit pas en cause nous avons procédé à une deuxième série d'expérimentation mais avec une voie d'administration intraveineuse chez 16 souris ( $n=8/\text{groupe}$ ). Nous n'avons également pas observé de différence sur la survie (42 vs 37%,  $p=0,74$ ). Afin de nous assurer que ces résultats n'étaient pas dûs à un manque de puissance, nous avons rassemblé les données des deux expérimentations, mais toujours sans résultats sur la survie (38 vs 31%,  $p=0,56$ ).

Il nous est donc apparu que dans notre modèle le bevacizumab n'apportait pas de bénéfice sur la survie, malgré une réalisation très proche du modèle de Jeong *et al.* Une des explications pour la différence observée pourrait être le dosage légèrement différent entre les 2 études. En effet dans le travail de Jeong *et al* les résultats les plus bénéfiques étaient observés pour des doses faibles de 0,1 mg/kg alors que la dose de 1 mg/kg n'apportait pas de bénéfice. Dans notre étude nous avons utilisé une dose intermédiaire de 0,5 mg/kg. Une explication pourrait être un retard à la cicatrisation par une inhibition trop importante de la voie VEGF et de la néoangiogenèse associée. Dans une méta-analyse récente, Zhang *et al* identifièrent l'utilisation de bevacizumab comme facteur de retard à la cicatrisation post-opératoire carcinologique avec un odds-ratio de 2,32 [1,43-3,75]<sup>284</sup>. Néanmoins aucun travail postérieur à celui de Jeong *et al* n'a démontré de bénéfice à l'utilisation du bevacizumab lors de sepsis expérimentaux. De plus 2 travaux prospectifs chez l'Homme ont été déposés. Le premier, initié en 2010, visait à évaluer l'effet du bevacizumab (10 mg/kg IV) lors du choc septique chez 20 patients (NCT01063010). Le deuxième, initié en 2011, visait à évaluer le bevacizumab (10 mg/kg IV) chez 75 patients présentant un SDRA d'origine septique (NCT01314066). A ce jour les études ont été arrêtées sans qu'aucun patient n'y ait été randomisé. Tout ceci interroge sur la pertinence de l'utilisation de cet anticorps au cours des processus septiques. Nous n'avons donc pas souhaité poursuivre plus avant les investigations sur cette molécule et avons publié nos résultats sous forme de lettre à l'éditeur.

LETTER

Open Access



## Does anti-VEGF bevacizumab improve survival in experimental sepsis?

Emmanuel Besnier<sup>1,2\*</sup> , Ebba Brakenhielm<sup>1</sup>, Vincent Richard<sup>1</sup> and Fabienne Tamion<sup>1,3</sup>

See related research by Jeong et al. <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc12742>

In a previous issue of *Critical Care*, Jeong et al. reported a beneficial effect of bevacizumab (Bev), the first humanized vascular endothelial growth factor (VEGF)-neutralizing antibody, on vascular permeability and mortality in a murine model of sepsis [1]. VEGF has been associated with mortality during sepsis [2], and the administration of its natural antagonist improved survival in experimental sepsis [3]. Jeong et al. demonstrated that Bev reduced mortality in sepsis induced either by cecal ligature puncture (CLP) or by endotoxemia. Despite promising experimental data, no other study has yet confirmed these results. A clinical study was planned to evaluate Bev administration in critically ill patients but it was withdrawn before enrolment (NCT01063010).

Thus, we aimed to reassess the potential benefit of Bev during experimental sepsis. After approval by the *Haute-Normandie* ethics committee (number 8092), male C57Bl6 mice received intraperitoneal NaCl (control) or Bev (0.5 mg/kg) immediately before CLP ( $n = 15$ /group), performed as described previously [4]. Briefly, the cecum was ligated (75% of total length) and punctured bilaterally with a 21G needle. Topical lidocaine (2%) was applied and mice received a sub-cutaneous administration of the antibiotic ofloxacin (30 mg/kg), the analgesic tramadol (40 mg/kg), and NaCl (30 ml/kg). Survival was

evaluated twice per day for 10 days and analyzed through a log-rank test.

No significant difference in mortality was observed between the Bev and control groups (36 versus 27% at day 10,  $p = 0.64$ ). To overcome any non-optimal effect linked to the route of administration, and also to better mimic clinical use, we repeated the experiments with intravenous injection of Bev before surgery ( $n = 8$ /group). Again, we did not observe any effect on mortality compared to CLP controls (42 versus 37% at day 10,  $p = 0.74$ ). Pooling the data between experiments (Bev treatment either IP or IV versus controls;  $n = 23$ /group) also did not show any statistical difference (38 versus 31%,  $p = 0.56$ ; Fig. 1).

Even if our experimental procedure slightly varies, notably regarding the severity of sepsis, with a larger puncture site, and the use of intravenous route in some of the mice, these results contradict those described by Jeong et al. The absence of replication of their results may be surprising, notably regarding the suspected effects of the VEGF pathways in sepsis. Although we cannot identify the origin of this contradiction, the absence of new publications on this topic, in association with our negative results, raises the question of the clinical rational of anti-VEGF treatment in septic patients.

\* Correspondence: [emmanuel.besnier@chu-rouen.fr](mailto:emmanuel.besnier@chu-rouen.fr)

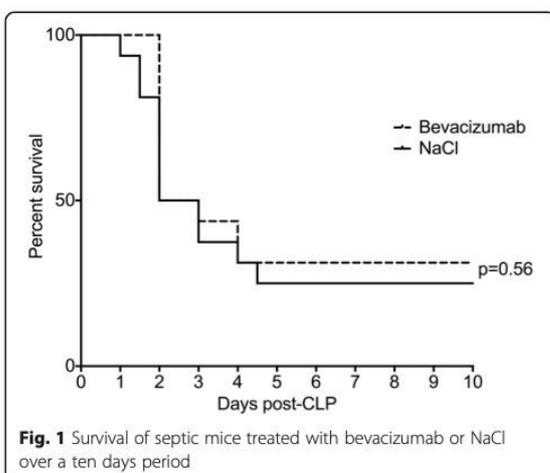
<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, 76000 Rouen, France

<sup>2</sup>Department of Anaesthesia and Critical Care, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

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



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



- Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC, et al. A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock*. 2008;29:452–7.
- Tsao PN, Chan FT, Wei SC, Hsieh WS, Chou HC, Su YN, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit Care Med*. 2007;35:1955–60.
- Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp JoVE*. 2011;51:e2860.

#### Abbreviations

Bev: Bevacizumab; CLP: Caecal ligation and puncture; VEGF: Vascular endothelial growth factor

#### Acknowledgements

Not applicable.

#### Funding

Funding by the French national institute for research (INSERM).

#### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Authors' contributions

EB: experimentation, writing of manuscript. Ebr: study design. VR: reviewing. FT: supervising. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Ethics approval and consent to participate

All experiments were realized in accordance with the European directive 2010/63/EU and were approved by the *Haute-Normandie* ethic committee (approval number 8092).

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, 76000 Rouen, France. <sup>2</sup>Department of Anaesthesia and Critical Care, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France. <sup>3</sup>Medical Critical Care Unit, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France.

Published online: 05 July 2017

#### References

- Jeong SJ, Han SH, Kim CO, Choi JY, Kim JM. Anti-vascular endothelial growth factor antibody attenuates inflammation and decreases mortality in an experimental model of severe sepsis. *Crit Care*. 2013;17:R97.

### 3.3. Partie 3 : impact d'un soluté de lactate de sodium molaire sur la microcirculation, la fuite capillaire et la fonction cardiaque dans un modèle murin de sepsis

#### Résumé

Ce travail est actuellement en cours de soumission dans des revues internationales

#### Rationnel :

Dans ce travail, nous avons pour objectif d'explorer les effets de l'administration d'un soluté de lactate de sodium molaire (11,2%, osmolarité 2000 mosmol/L) sur la microcirculation, notamment sur la fuite capillaire et la perfusion mésentérique. Nous avons également voulu évaluer les effets sur la fonction cardio-circulatoire et sur l'inflammation.

A cette fin, nous avons réalisé un modèle expérimental de sepsis par ligature et perforation caecale chez le rat<sup>285,286</sup> et comparé les effets de l'administration continue de divers solutés : NaCl 0,9% (contrôle isotonique, CLP-NaCl), bicarbonate de sodium 8,4% (contrôle hypertonique, CLP-HSB), lactate de sodium 11,2% (CLP-HSL). Les groupes CLP-HSB et CLP-NaCl étaient supplémentés avec du glucose 8% afin d'obtenir les mêmes apports caloriques théoriques que le groupe CLP-HSL. Un groupe sham indemne de sepsis (mais avec laparotomie et cervicotomie) a également été réalisé. Après randomisation la procédure chirurgicale consistait en une cervicotomie droite permettant une isolation de la veine jugulaire externe et la mise en place d'un cathéter de 3F en polyuréthane. Une laparotomie médiane était ensuite réalisée afin d'extérioriser le caecum, le ligaturer sur environ 75% de son volume, puis une petite quantité de selles était exprimée et déposée dans le péritoine avant fermeture musculo-cutanée. Les animaux étaient analgésiés par une administration de tramadol 20 mg/kg sous-cutané et lidocaine 1% topique. La perfusion continue intraveineuse des fluides au débit de 2,5 mL/kg/h était débutée dès fermeture abdominale et après un bolus intraveineux de 1 mL de NaCl 0,9% pour compenser les éventuelles pertes sanguines per opératoire. Après 18 heures de perfusion les animaux étaient sacrifiés pour les diverses expérimentations. En raison d'une surmortalité observée dans le groupe CLP-HSB en cours de perfusion, nous n'avons pas poursuivi les inclusions dans ce groupe. Les analyses ont donc porté uniquement sur les trois groupes sham, CLP-HSL et CLP-NaCl.

Trois sets d'expérimentation étaient réalisés en raison de l'incompatibilité technique à être réalisés en même temps :

- 1) Expérimentation 1 : nous avons analysé la microcirculation mésentérique par *laser speckle imaging*. Après anesthésie profonde, une laparotomie médiane était réalisée et les anses intestinales étaient exposées. La perfusion mésentérique distale était mesurée sur 4 sites intestinaux. Nous avons ensuite réalisé une analyse de la fonction par échocardiographie permettant d'obtenir le débit cardiaque, la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche et les indices statiques de précharge ventriculaire :

ratio du flux mitral E/A et diamètre télédiastolique ventriculaire gauche. Les différents organes (coeur, rein, foie, poumons, intestin, muscle) étaient ensuite prélevés pour analyse ultérieure, puis un prélèvement sanguin maximal était réalisé afin de mesurer différents paramètres biochimiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , urémie, glycémie), inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-10}$ ) et endothéliaux (VEGF, syndecan-1). Nous avons également réalisé la mesure de divers paramètres métaboliques sanguins (lactate, pyruvate, acétoacétate, 3-hydroxybutyrate). Nous avons inclus 10 animaux par groupe (calcul d'effectif *a priori* basé sur le critère de jugement principal de l'étude, *i.e.* la variation de la microcirculation mésentérique).

- 2) Expérimentation 2 : cette expérimentation a été réalisée en collaboration avec le centre de recherche clinique CHUS de l'université de Sherbrook (Canada, Dr D Coquerel, Pr O Lesur). La fuite capillaire a été étudiée par épreuve au bleu d'Evans. Après la fin de la perfusion du soluté étudié, une injection de 30 mg/kg de bleu d'Evans était réalisée puis 45 min plus tard l'animal était anesthésié et le secteur vasculaire rincé au paraformaldéhyde. Les organes étaient alors prélevés, déshydratés 5 jours à 60°C puis incubés 3 jours dans du formamide pour élution du bleu intra-tissulaire. L'absorbance du surnageant était alors mesuré par spectrophotométrie à 620 nm. Nous avons inclus 5 animaux par groupe.
- 3) Expérimentation 3 : nous avons approfondi l'étude de la fonction cardiaque par cathétérisme cardiaque gauche. A la fin de la perfusion du soluté, les animaux étaient anesthésiés et une cervicotomie droite était réalisée. La carotide était cathétérisée puis une sonde micro-manométrique était montée jusque dans le ventricule gauche (Millar Instrument) pour l'enregistrement des pressions et des volumes ventriculaires.

#### Résultats :

Nous avons mis en évidence que la perfusion de HSL entraînait une amélioration significative de la perfusion microcirculatoire mésentérique versus NaCl ( $712 \pm 366$  vs.  $286 \pm 129$  unités,  $p=0.0006$ ) ainsi qu'une amélioration significative de la fuite capillaire. En effet la diffusion du bleu d'Evans était réduite dans le groupe CLP-HSL versus CLP-NaCl pour le poumon ( $94 [78-136]$  vs  $300 [253-452]$ ,  $p=0.006$ ), l'intestin ( $37 [31-43]$  vs  $113 [88-189]$ ,  $p=0.03$ ) et le foie ( $24 [14-37]$  vs  $70 [50-89]$ ,  $p=0.04$ ). Aucune différence n'était objectivée pour le cœur. De même, la balance hydrique (perfusion solutés - diurèse) était fortement réduite dans le groupe CLP-HSL versus CLP-NaCl ( $-1.5 [-1.7-0.7]$  vs  $2.0 [1.6-2.2]$  mL/kg/hr,  $p=0.002$ ). Le marqueur d'agression du glycocalyx syndecan-1 n'était pas différent entre les groupes mais on observait une réduction des taux plasmatiques de VEGF ( $198 [185-250]$  vs  $261 [250-287]$  pg/mL,  $p=0,009$ ).

La fonction rénale était améliorée par la perfusion de HSL vs NaCl avec une diminution de l'urémie ( $9.6 [8.5-10.7]$  vs  $16.2 [11.3-24.6]$ ,  $p=0.04$ ) et une augmentation de la diurèse. De plus, bien que la charge sodée

soit plus importante par la perfusion de HSL, la natriurèse était plus importante dans le groupe CLP-HSL, conduisant à un bilan entrée-sortie sodé non significatif entre les 2 groupes ( $\Delta\text{Na}^+$  : 4.9 [2.7-6.2] vs 2.4 [2.4-2.8],  $p=0.06$ ) malgré une natrémie supra-normale dans le groupe CLP-HSL (153 [150-157] vs 141 [140-143],  $p=0.02$ ).

Concernant la fonction cardiaque, la perfusion d'HSL était associée à une amélioration de l'index cardiaque (0.34 [0.28-0.43] vs 5 0.14 [0.01-0.18] mL/min/g,  $p<0.0001$ ) et de la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche (55 [46-73] vs 39 [33-52] %,  $p=0.009$ ) versus NaCl. Il n'y avait pas de différence concernant les indices statiques de précharge E/A et les diamètres télédiastoliques ventriculaires. L'étude complémentaire par cathétérisation ventriculaire gauche a mis en évidence une amélioration par l'HSL versus NaCl de la pente  $dP/dt_{\text{max}}$ , reflet d'une amélioration du travail myocardique. Néanmoins, puisqu'aucune différence n'était observée entre les deux groupes concernant la relation pression-volume télésystolique ventriculaire gauche, il est probable qu'une amélioration de la volémie ait pu participer à cette amélioration du travail ventriculaire systolique gauche. D'un autre côté, nous avons observé après HSL une amélioration de la relation pression-volume télédiastolique ventriculaire gauche, témoin d'une amélioration de la compliance cardiaque indépendante de la précharge.

L'analyse des paramètres inflammatoires a mis en évidence une diminution importante de l'inflammation systémique dans le groupe CLP-HSL versus CLP-NaCl (IL-1 $\beta$  : 272  $\pm$  215 vs 993  $\pm$  85 pg/mL,  $p=0.004$ , TNF $\alpha$  : 28  $\pm$  23 vs 59  $\pm$  31 pg/mL,  $p=0.005$ , IL-10 : 601  $\pm$  523 vs 1015  $\pm$  389 pg/mL,  $p=0.02$ ). Ceci était associé à une diminution de l'expression tissulaire myocardique du TNF $\alpha$  objectivée par PCR quantitative (-30%,  $p<0,05$ ).

Au niveau métabolique, la perfusion d'HSL induisait une augmentation significative de la lactatémie (6.7  $\pm$  4.6 vs 3.5  $\pm$  1.5,  $p=0.04$ ) mais également de la pyruvatémie (249  $\pm$  186 vs 122  $\pm$  51,  $p=0.03$ ) et de la glycémie (9.4  $\pm$  4.5 vs 4.9  $\pm$  1.1,  $p=0.002$ ). Le ratio lactate/pyruvate n'est pas différent entre les groupes. Tout cela témoigne de la métabolisation du lactate perfusé. Il existait également une augmentation du corps cétonique 3-hydroxybutyrate par la perfusion d'HSL (445  $\pm$  303 vs 212  $\pm$  105,  $p=0.03$ ).

Ce travail met donc en évidence un effet bénéfique de l'administration de lactate de sodium molaire dans un modèle expérimental de sepsis avec amélioration de la microcirculation, de la fonction cardiaque systolique et diastolique, et de l'inflammation.

## Hypertonic Sodium Lactate During Sepsis: Impact on Microcirculation, Cardiac function and Inflammation in a murine model

Emmanuel Besnier (MD)<sup>1,2</sup>, David Coquerel (PhD)<sup>3\*</sup>, Geoffrey Kouadri (MD)<sup>1,2\*</sup>, Thomas Clavier (MD)<sup>1,2</sup>, Raphael Favory (MD,PhD)<sup>4,5</sup>, Thibault Duburcq (MD)<sup>4</sup>, Olivier Lesur (MD, PhD)<sup>3,6</sup>, Soumeiya Bekri (MD, PhD)<sup>7</sup>, Vincent Richard (MD, PhD)<sup>1</sup>, Paul Mulder (MD, PhD)<sup>1</sup>, Fabienne Tamion (MD, PhD)<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU- REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

<sup>2</sup> Departements of Anesthesia and Critical Care, Rouen University Hospital, France

<sup>3</sup> Division of Intensive Care Units, Centre de Recherche Clinique du CHUS, Université de Sherbrooke, Canada

<sup>4</sup> Intensive Care Unit, Lille University Hospital, France

<sup>5</sup> LIRIC Inserm U995 Glycation: From Inflammation to Aging, Lille, France

<sup>6</sup> Pharmacology Institute of Sherbrooke, Centre de Recherche Clinique du CHUS Université de Sherbrooke, Canada

<sup>7</sup> Institute of Clinical Biology, Rouen University Hospital, France

<sup>8</sup> Medical Intensive Care Unit, Rouen University Hospital, France

\* These authors equally contributed to the study

Corresponding author:

Dr Emmanuel Besnier

Departement d'Anesthésie-Réanimation

CHU Charles Nicolle

1 rue de Germont 76031 Rouen Cedex, France

33232881705

[Emmanuel.besnier@chu-rouen.fr](mailto:Emmanuel.besnier@chu-rouen.fr)

abbreviated title : Sodium lactate improves sepsis outcomes

Abstract 276

Total word count: 3999 (Introduction 469, Material and Methods 1429, Results 659, Discussion 1441)

Number of figures/tables: 5/2

Conflict of interest: none

Prior presentations at meetings:

European Society of Intensive Care Medicine congress, Berlin the 30<sup>th</sup> September 2019

Annual Congress of *Société de Réanimation de la Langue Française*, Paris the 24<sup>th</sup> January 2019

Support: Support was provided from institutional sources (Normandie University of Rouen and the Inserm U1096 unit)

1 Background: Hypertonic sodium lactate (HSL) fluid has shown beneficial effects during  
2 endotoxemia, but the mechanisms are unknown and have not been appropriately studied. We  
3 aimed to evaluate the effect of HSL on major outcomes during experimental sepsis in rats  
4 (caecal ligation and puncture, CLP).  
5  
6  
7

8  
9 Methods: Three groups were analyzed (n=10 per group): Sham; CLP-NaCl 0.9%; CLP-HSL  
10 (2.5 mL/kg/h of fluids for 18 hours after CLP). Mesenteric microcirculation,  
11 echocardiography, cytokines and biochemical parameters were evaluated. Two additional  
12 experiments were performed for capillary leakage (Evans Blue, n=5/group) and pressure-  
13 volume (PV) cardiac loops (n=7/group).  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 Results: HSL improved mesenteric microcirculation (CLP-HSL 736 [407-879] vs. CLP-NaCl  
21 241 [209-391] UI/pixel, p=0.0006), cardiac output (0.34 [0.28-0.43] vs. 0.14 [0.10-0.18]  
22 mL/min/g, p<0.0001), left ventricular fractional shortening (55 [46-73] vs. 39 [33-52] %,  
23 p=0.009). PV loops showed raised dP/dt<sub>max</sub> slope (6.3 [3.3-12.1] vs. 2.7 [2.0-3.9] 10<sup>3</sup>  
24 mmHg/s, p=0.04), and a lower left ventricular end-diastolic pressure-volume relation (1.9  
25 [1.1-2.3] vs. 3.0 [2.2-3.7] RVU/mmHg, p=0.005). HSL reduced Evans Blue diffusion in the  
26 gut (37 [31-43] vs. 113 [63-142], p=0.03), the lung (108 [82-174] vs. 273 [222-445], p=0.006)  
27 and the liver (24 [14-37] vs 70 [50-89] ng EB/mg, p=0.04). Plasma levels of lactate and 3-  
28 hydroxybutyrate were higher in HSL (6.03 [3.08-10.30] vs. 3.19 [2.42-5.11] mmol/L, p=0.04;  
29 400 [174-626] vs. 189 [130-301] μmol/L, p=0.03). Plasma cytokines were reduced in HSL  
30 (IL-1β: 172 [119-446] vs. 928 [245-1470] pg/mL, p=0.004; TNFα: 17.9 [12.5-50.3] vs. 53.9  
31 [30.8-85.6] pg/mL, p=0.005; IL-10: 352 [267-912] vs. 905 [723-1243] pg/mL) as well as  
32 plasma VEGF-A (198 [185-250] vs. 261 [250-269] pg/mL, p=0.009).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Conclusions: Hypertonic sodium lactate fluid protects against cardiac dysfunction, mesenteric  
46 vascular alteration and capillary leakage during sepsis, and simultaneously reduces  
47 inflammation and enhances ketone bodies.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

## 1 Introduction

2 Sepsis is a major public health issue, estimated to be responsible for about 6 million  
3 deaths per year worldwide, and septic shock has an estimated mortality up to 30%<sup>1,2</sup>. Fluid  
4 infusion is essential to maintain or restore cardiac preload and therefore end-organ perfusion  
5 and oxygenation. However, excessive fluid therapy may lead to a positive fluid balance that  
6 has been previously described to be associated with mortality during septic shock<sup>3,4</sup>.  
7 Moreover, intravenous fluids may augment septic endothelial dysfunction, potentially  
8 negating the beneficial hemodynamic effects of fluid resuscitation<sup>5</sup>. The nature of the  
9 administered fluid may be of importance and is currently the focus of an extensive  
10 literature<sup>6,7</sup>. Indeed, 0.9% sodium chloride (NaCl) is widely used but its administration may  
11 lead to hyperchloremia and induce metabolic acidosis, but also to renal vasoconstriction and a  
12 subsequent reduction in glomerular filtration<sup>8-10</sup>. Moreover, experimental study suggested a  
13 negative impact of NaCl on inflammatory processes<sup>11,12</sup>. “Balanced fluids” containing a low  
14 chloride concentration, may limit these negative effects and result in less use of renal  
15 replacement therapy and fewer persistent renal dysfunction<sup>7</sup>. Lactate-containing fluids may  
16 also be of interest because of the absence of chloride, and may provide merits in critically ill  
17 patients, since resuscitation using hypertonic saline may result in volume expansion with a  
18 reduced infused volume. Moreover, lactate molecule itself may provide an additional energy  
19 supply through its oxidation<sup>13</sup>. Energy crisis constitutes a major pathophysiology element of  
20 septic organ failure. Indeed, several metabolic pathways are disturbed with alteration of  
21 mitochondrial function, resistance to insulin (and subsequent hyperglycemia) and defect in  $\beta$ -  
22 oxidation<sup>14-16</sup>. Several data now argue that L-lactate is a major metabolite during  
23 inflammation and sepsis and represent an important source of energy for various organs,  
24 including the heart<sup>17-19</sup>. Thus, the interest of lactate administration during critical illness is  
25 rising<sup>20</sup>. Some experimental and human studies observed beneficial effects of molar

1 hypertonic sodium lactate (HSL) in various settings, notably during brain injury or cardiac  
2 dysfunction<sup>21-24</sup>. Moreover, its administration during endotoxemia in pigs showed  
3 improvement in microcirculation, hemodynamic, oxygenation, renal function and fluid  
4 balance, even in comparison with the hypertonic balanced control sodium bicarbonate<sup>25-27</sup>.  
5 Nevertheless, these studies presented several limits: 1) the improvement of cardiac function  
6 was not properly assessed; 2) the capillary leakage, suggested by the improvement of fluid  
7 balance, was not specifically evaluated; 3) the transposition of endotoxemia to sepsis remains  
8 limited<sup>28</sup>. In contrary, in an ovine model of septic shock, administration of HSL was  
9 associated with more pronounced decreases in blood pressure and cardiac function, earlier  
10 onset of impaired tissue perfusion, and shorter survival time<sup>29</sup>.  
11 We therefore explored the effects of HSL in a murine model of sepsis to challenge these  
12 results and to deepen the underlying mechanisms. The main objective of this experimental  
13 study was to evaluate the effects of HSL on the mesenteric microcirculation using a septic  
14 model.

15

1 **1 Material and methods**

2 We realized a prospective, randomized, controlled experimental study. All experiments were  
3 approved by the Regional Ethics Committee for Animal Research and the *Ministère de la*  
4 *l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation* under the approval number  
5 #8093-2016112515181383. All procedures were performed in accordance with the French  
6 Ethics Committee as well as the guidelines of the European Parliament directive 2010/63/EU  
7 and the Council for the Protection of Animals Used for Scientific Purposes under the  
8 supervision of an authorized investigator. The elaboration of this manuscript adheres to the  
9 ARRIVE guidelines.

10

11 **Animal procedures**

12 The primary objective of our study was to assess the impact of HSL versus 0.9% NaCl on  
13 microcirculation. Randomization was performed using sealed envelopes. In case of  
14 unexpected death before the end of infusion, an additional randomization was performed.  
15 Based on previous data<sup>27</sup>, we *a priori* calculated a number of 10 animals per group to be  
16 sufficient to identify a difference of 20% in mesenteric microcirculatory flow between groups  
17 with a 5%  $\alpha$ -risk and 90% power. Some secondary objectives necessitated additional animals  
18 because of incompatibility with the microcirculation study. Based on our previous experience,  
19 5 animals per groups were included for Evans Blue and 7 animals per group for pressure-  
20 volume loops.

21

22 **Study Design**

23 Male Sprague-Dawley rats, weighting 400-500g (Janvier Labs, France), were housed at a  
24 constant temperature (21°C) with 14 h/10 h light/dark cycle. All animals had free access to  
25 standard chow and drinking tap water until the beginning of the study. The model of sepsis

1 consisted in a peritonitis by caecal ligation and puncture (CLP). The day of the experiment,  
2 animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (75/5 mg/kg).  
3 After skin sterilization (alcoholic-povidone-iodine), a cervicotomy was performed to insert a  
4 3F polyurethane perfusion catheter (Instech Laboratories, USA) in the right external jugular.  
5 The catheter was tunnelled under skin and connected to a perfusion harness (Instech  
6 Laboratories, USA). A median laparotomy was then performed to expose the caecum. After  
7 ligation of 75% of its volume, a 16G puncture was performed to externalize feces in the  
8 peritoneal cavity. Muscular fascia and skin were sutured using 2.0 vicryl (Ethicon, USA).  
9 Analgesia was performed using topical 1% lidocaine and subcutaneous tramadol (20 mL/kg).  
10 One mL of 0.9% NaCl was i.v injected at the end of procedure. This model of sepsis has been  
11 observed to produce a 60% mortality at 48 hrs (data not published).  
12 The study design is presented in figure 1. At the end of procedure, animals were randomized  
13 in four groups: HSL receiving 11.2% sodium lactate (1000 mmol/L of sodium + 1000  
14 mmol/L of lactate, APHP, France); NaCl receiving 0.9% NaCl (154 mmol/L of chloride +  
15 154 mmol/L of sodium); HSB receiving 8.4% sodium bicarbonate (1000 mmol/L of  
16 bicarbonates + 1000 mmol/L of sodium); sham with cervicotomy and laparotomy but no  
17 catheter/CLP. Unfortunately, only 2 over the 6 first rats in the HSB group survived. For  
18 ethical reasons, and in accordance with the legislative authorizations delivered for this study,  
19 we did not complete this group and continued the inclusions in the 3 other groups (Sham,  
20 CLP-NaCl and CLP-HSL). Except for the sham group, rats received a 2.5 mL/kg/h infusion  
21 of fluids for a 18 h period<sup>30</sup>. Because lactate provides 0.32 kcal/mL, NaCl group received an  
22 equivalent number of calories by the addition of 0.087g/mL of dextrose in the perfused  
23 fluid<sup>25</sup>. Only sham had free access to water during the experiment. Three different set of  
24 experiments were realized: 1) echocardiography and laser speckle (n=10/group); 2) Evans  
25 blue (n=5/group); 3) pressure-volume loops (n=7/group).

1

2 Echocardiography

3 Transthoracic echocardiography was performed using a Vivid 7 ultrasound device (GE

4 Healthcare, France) using a 11 Mhz linear probe. The heart was imaged with a two-

5 dimensional parasternal short axis view. After visualization of the pillars of mitral valve, M-

6 Mode imaging was performed measuring the left ventricular end-diastolic and end-systolic

7 diameters (LVEDD and LVESD). Left ventricular fractional shortening (LVFS) was

8 calculated as  $LVFS = \left( \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \right) \times 100$ . Then, an apical view of the left ventricle was

9 performed and a pulsed wave Doppler was used for acquisition of mitral peak velocity flow

10 during diastole. The ratio between early (E) and late (A) peak velocities was calculated (E/A

11 ratio). Proximal pulmonary artery (PA) was recorded for heart rate (HR), radius and velocity

12 time integral (VTI), allowing the calculation of stroke volume

13 ( $SV = \pi \times PA \text{ [radius]}^2 \times VTI$ ) and cardiac output (CO=SV x HR), expressed per gram

14 of animal.

15

16 Analysis of mesenteric perfusion

17 After echocardiography, a wide median laparotomy was performed. The ileum was disposed

18 in a similar manner in all animals. Microcirculation acquisition was performed by Laser

19 Speckle Contrast Imaging at a 20 cm distance and a 1500 frames/256 colors acquisition

20 (MoorLFPI-2 Full Field Laser Perfusion Imager – Moor Instruments, UK). Image analysis

21 was performed in four similar regions of interest on the gut, distant from the jejunal site, and

22 mean values are expressed as perfusion units (PU).

23

24 Capillary leakage and Evans Blue assay

5

1 Thirty mg/kg of 1% Evans blue (Sigma, France) was injected intravenously over a 2 min  
2 period. 45 min later, the animal was anesthetized and, after opening of the right auricula, a  
3 18G cannula was inserted through the left ventricle into the ascending aorta to flush away  
4 intravascular dye from the bloodstream by 1% paraformaldehyde (PFA) perfusion in  
5 heparinized saline solution, at a pressure of 120 mmHg for 3 min. Heart (left ventricle), lungs,  
6 gut and liver samples were taken and dehydrated at 60°C for 5 days. The samples were  
7 incubated in a 10% solution of formamide (10  $\mu$ L/mg of tissue, Sigma, France) at 37°C for 3  
8 days and then centrifuged at 3000G for 15 min. The absorbance of the supernatant was  
9 measured using spectrophotometry at 620 nm.

10 Fluid-Balance was recorded in NaCl and HSL rats by measuring urine output and subtract  
11 from fluids infused.

12

### 13 Hemodynamics

14 Left-ventricular (LV) pressure-volume loops and hemodynamics were obtained using a  
15 miniaturized combined conductance catheter-micromanometer (model SPR-671, Millar  
16 Instruments, USA) connected to a pressure-conductance unit (MPCU-2000, Millar  
17 Instruments, USA), after insertion through the right carotid into the LV under pressure  
18 control. LV end-systolic pressure (LVESP), LV end-diastolic pressure (LVEDP),  $dP/dt_{min}$ ,  
19  $dP/dt_{max}$  and LV relaxation constant Tau (Weiss Method) were recorded/calculated. Pressure-  
20 volume loops were recorded at baseline and during gently occlusion of abdominal aorta to  
21 calculate LVESP and LVEDP- relation (LVESPVR and LVEDPVR) calculated as indicators  
22 of load-independent LV contractile function and LV compliance. Blood pressure was  
23 measured immediately before crossing the aortic valve.

24

### 25 Biological parameters

1 At the end of procedure, a maximal volume of blood was sampled form the abdominal aorta  
2 and then centrifuged at 1500 G for 15 min before immediate freezing in liquid nitrogen and  
3 storage at -80°C until assays.

4 Inflammation and capillary leakage related markers: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-10,  
5 Vascular Endothelial Growth Factor type (VEGF-A) and syndecan-1 were measured using  
6 ELISA specific kit (VEGF-A, syndecan-1: MyBioSource, USA; others: RD-system, USA).  
7 Urea, sodium, potassium and chloride were measured (Catalyst One, IDEXX, USA). Urine  
8 concentration of sodium, potassium and chloride were also measured, and absolute quantity of  
9 ions excreted during the experiment was calculated. Then, the difference between the infused  
10 and excreted amount of ion during the whole experiment was calculated as  $\Delta_{ion}=(ion\ fluid$   
11  $concentration)*(volume\ of\ infused\ fluid)-(ion\ urinary\ concentration)*(volume\ of\ urine)$  and  
12 reflected the body excess of ion over the infusion period.

13 Metabolism: metabolization of lactate may take place through its oxidation into  
14 pyruvate, which in turn may proceed to either the oxidative pathway, the gluconeogenesis  
15 route or the production of ketone bodies. Glucose blood content was performed using portable  
16 meters (Accu-check<sup>®</sup> performa, Roche, USA). Deproteinization of blood was performed  
17 before measurement of plasma concentration of lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate and  
18 acetoacetate: perchloric acid was added to blood in a 1:1 ratio and then 3 rounds of  
19 centrifugation at 3500 G during 15 min were realized before frozen at -20°C.

## 20 21 Statistical Analysis

22 The distribution of data was evaluated using a d'Agostino test. Data are presented as medians  
23 with interquartiles (IQ1-IQ3) or means with standard deviations ( $\pm$ SD), according to the  
24 normality of distribution. Comparisons between groups were realized using a non-parametric  
25 test (Kruskall-Wallis or Mann and Whitney) or a parametric test (ANOVA or t-student), and

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63

1 in case of significant results, *post-hoc* analyses were performed using either a Dunn's or a  
2 Holm-Sidak's multiple comparisons test. Two comparisons were realized: CLP-NaCl group  
3 versus Sham and CLP-NaCl group versus CLP-HSL. The comparison between Sham and  
4 HLS was not relevant to the study and may reduce the power of the analyses. All comparisons  
5 were realized using Prism v6.0 (GraphPad, USA). P<0.05 was considered significant. In case  
6 of missing data concerning the secondary endpoints of each set of experiments, the median  
7 value of the control group was applied to favor the null hypothesis.

8  
9

1 **Results**

2 Over the 22 rats per group (for the 3 sets of experiments), 2 in the HSL group and 1 in the  
3 NaCl group died before the end of the perfusion.

4

5 *Mesenteric Perfusion*

6 The mean value of mesenteric perfusion was markedly reduced in the CLP-NaCl group in  
7 comparison with the sham group (286 ±129 vs. 957 ±169 PU, p<0.0001). On the contrary,  
8 HSL greatly enhanced perfusion in comparison with NaCl in CLP rats (712 ±366 vs. 286  
9 ±129 PU, p=0.0006, figure 2).

10

11 *Capillary leakage*

12 Evans blue diffusion increased in the CLP-NaCl compared with sham, in lungs (300 [253-  
13 452] vs 149 [83-152], p=0.04), gut (113 [88-189] vs 35 [21-41], p=0.009) and liver (70 [50-  
14 89] vs 18 [15-26], p=0.02) (figure 3). No difference was observed for the heart. Conversely,  
15 in CLP rats, HSL resulted in a reduction of Evans Blue diffusion in comparison with NaCl for  
16 lungs (94 [78-136] vs 300 [253-452], p=0.006), gut (37 [31-43] vs 113 [88-189], p=0.03) and  
17 liver (24 [14-37] vs 70 [50-89], p=0.04), but not for the heart (figure 2). Similarly, diuresis  
18 and fluid balance were drastically improved by HSL versus NaCl (respectively 3.9 [3.2-4.1]  
19 vs 0.3 [0.3-0.8] mL/kg/h, p=0.008 and -1.5 [-1.7--0.7] vs 2.0 [1.6-2.2] mL/kg/hr, p=0.002,  
20 figure 3).

21

22 *Echocardiography*

23 The CLP-NaCl group presented a reduced cardiac output in comparison with sham (0.14  
24 [0.01-0.18] versus 0.30 [0.26-0.34] mL/min/g, p=0.004) despite the absence of difference for  
25 LV fractional shortening (39 [33-52] vs 44 [41-47]%, p=0.9) (figure 4). Concerning the

1 preload static index available in our model, LVEDD was reduced in CLP-NaCl group versus  
2 Sham (6.2 [5.2-7.3] vs 9.4 [8.8-9.6] mm,  $p=0.001$ ) but no difference was observed concerning  
3 the E/A mitral flow ratio ( $1.3 \pm 0.4$  vs  $1.7 \pm 0.5$ ,  $p=0.2$ ). Left ventricular systolic function was  
4 greatly improved by HSL vs NaCl in CLP rats with higher cardiac output ( $0.34 [0.28-0.43]$  vs  
5  $0.14 [0.01-0.18]$  mL/min/g,  $p<0.0001$ ) and shortening fraction ( $55 [46-73]$  vs  $39 [33-52]$  %,  $p=0.009$ ). No difference concerning the preload static index was observed (LVEDD:  $6.5 [6.3-$   
6  $6.8]$  vs  $6.2 [5.2-7.3]$  mm,  $p=0.6$ ; E/A ratio:  $1.4 \pm 0.5$  vs  $1.3 \pm 0.4$ ,  $p=0.8$ ).

8

### 9 *LV Pressure-Volume Loops*

10 Results are presented in table 1. In comparison with Sham, CLP-NaCl presented reduced  
11 mean, diastolic, systolic and pulse arterial pressure. Pressure tracings showed a reduction in  
12  $dP/dt_{max}$  and LVESP, resulting from a reduction in ventricular inotropism. Nevertheless,  
13 LVESPVR was not different, suggesting that the alteration of inotropism may be related to an  
14 alteration of cardiac pre- and afterload. On the contrary,  $dP/dt_{min}$  and LVEDPVR were  
15 modified in CLP-NaCl rats, suggesting an alteration of ventricular compliance, independent  
16 from the cardiac pre-load.

17 The administration of HSL did not result in different level of arterial blood pressure versus  
18 NaCl, but a higher  $dP/dt_{max}$  and no difference in LVESPVR, suggesting an improvement in  
19 inotropism but possibly related to an increase in preload, and an improvement in LVEDPVR,  
20 suggesting an improvement in ventricular compliance independently from the cardiac preload.

21

### 22 *Biological parameters*

23 Results are presented in table 2. In CLP rats, infusion of HSL was associated with a  
24 significant rise in sodium plasma concentration, and in sodium urinary excretion, while  
25 plasma chloride and potassium were reduced.  $\Delta Na^+$ , representing the body accumulation of

1 sodium over the infusion period, was not significantly different between HSL and NaCl  
2 groups.  
3  
4 Urea was two-fold higher in CLP-NaCl compared to Sham , whereas HSL resulted in a lower  
5  
6 plasma level.  
7  
8 Concerning metabolism, the CLP-NaCl group presented a two-fold reduction in glycemia  
9  
10 versus sham with a reduction in plasma 3-hydroxybutyrate. Conversely, HSL was associated  
11  
12 with higher plasma levels of glucose, lactate, pyruvate and 3-hydroxybutyrate in comparison  
13  
14 with NaCl. No difference was observed for acetoacetate.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

#### 22 *Inflammation*

23  
24 The CLP-NaCl group presented an enhanced inflammation in comparison with sham with an  
25  
26 important rise in cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-10 (figure 5 and table 2). HSL reduced  
27  
28 plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10 versus NaCl.  
29  
30  
31 No difference was observed for VEGF-A or syndecan-1 between sham, NaCl and HSL groups  
32  
33  
34 except a slight reduction in VEGF-A levels between NaCl and HSL groups.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

1 **Discussion**

2 Our study highlights the beneficial effects of HSL on micro and macro-circulation, cardiac  
3 function and inflammation during sepsis. Our results suggest that these beneficial effects may  
4 be, at least partially, due to an improvement in cell bioenergetics with oxidation of lactate.

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12 *HSL modulation of CLP-induced alteration in mesenteric microcirculation*

13  
14 Vascular dysfunction precedes tissue damage and end-organ dysfunction in sepsis. HSL  
15 greatly improved microcirculation with 1) tissue perfusion comparable to sham animals, 2)  
16 reduction in capillary leakage, 3) reduction in fluid-balance. The endothelium is essential for  
17 the regulation of fluid movement across the endothelium and is notably regulated by the  
18 glycocalyx layer at the surface of endothelial cells<sup>31,32</sup>, and the adherens junctions between  
19 these cells<sup>33</sup>. Endothelial junctional complexes are regulated by several signaling pathways,  
20 among which the VEGF-A/VEGF-R system plays a major role. VEGF-A is known for its  
21 endothelial barrier-breaking properties and for its potential stimulation of vascular  
22 permeability, promoting the endocytosis of the adhesion molecule VE-cadherin<sup>34</sup>. High levels  
23 of VEGF-A may lead to an enlargement of intercellular gap and therefore fluid shift to  
24 interstitium and have been described to be associated with severity of sepsis<sup>35</sup>. Our results  
25 highlight a reduction in the circulating levels of VEGF-A in the HSL group. We can  
hypothesize that the reduction of vascular permeability may be in part secondary to this  
reduction in VEGF-A levels. Nevertheless, many other factors are implicated in regulation of  
vascular permeability, such as Angiopoietin-2, Slit/Robo4 or Heparin-Binding-Protein<sup>33</sup>, and  
may explained the observed discrepancy between an important improvement in capillary  
leakage and a small difference in VEGF-A levels. Despite several publication described a  
degradation of glycocalyx during sepsis<sup>32,36-38</sup>, we did not observe any difference concerning  
the proteoglycan syndecan-1. Nevertheless, our model focused on the early phase of sepsis

1 and a destruction may have been delayed in the pathogenesis. Indeed, syndecan-1 levels have  
2 been described to be elevated at day-2 after in septic patients, and correlated with fluid-  
3 balance<sup>36</sup>, whereas its dosage at admission was not associated with modification of fluid-  
4 balance, suggesting a time-dependent variation of this marker<sup>37</sup>. Moreover, inflammation  
5 occurring during sepsis may activate many proteolytic processes such as metalloproteinases,  
6 heparanase, and hyaluronidase, leading to vascular hyper-permeability through the  
7 degradation of many compounds of the glycocalyx, and we cannot rule out that other specific  
8 elements such as heparan-sulfate have been released. Indeed, we demonstrated in our model  
9 that inflammation is deeply reduced by the administration of HSL. This may be explained by  
10 the non-specific improvement in various functions (cardiac, microcirculation, renal), but also  
11 by a specific effect on inflammation pathways. Lactate may act through the G protein-coupled  
12 receptor GPR81, also known as Hydroxycarboxylic acid receptor, which senses both lactate  
13 and hydroxybutyrate and is widely distributed within the organism, notably in endothelial  
14 cells of the brain, heart and kidney<sup>39</sup>. This receptor has been demonstrated to modulate the  
15 expression of the inflammasome component NLRP3 and to reduce the production of IL-1 $\beta$ ,  
16 IL-6 and IL-12<sup>40,41</sup>. Thus, regulation of inflammatory process by HSL may be a corner stone  
17 of the improvement in endothelial dysfunction and microcirculation.

18

### 19 *Cardiac function*

20 In our CLP model, HSL improved both compliant and contractile cardiac functions.  
21 Improvement in cardiac output was associated with an improvement in myocardial efficiency  
22 as evidenced by the improvement in LVEF (TTE) and systolic slope dp/dt max (PV). The  
23 improvement in preload may be partly responsible for these changes, since left-ventricular  
24 end-diastolic pressure-volume relation was similar in the HSL and NaCl groups. However, it  
25 is likely that the contribution of volemia may be limited because of: 1) an absence of

1 difference in echocardiographic mitral flow and left ventricular end-diastolic diameters; 2) an  
2 absence of difference in blood pressure; 3) a non-significant increase in global sodium  
3 accumulation between groups ( $\Delta\text{Na}^+$ ). Moreover, our results show a preload-independent  
4 improvement in cardiac compliance – diastolic function, as observed by a reduction in the  
5 left-ventricular end-diastolic pressure-volume relation.

6 The improvement of cardiac function by HSL had already been demonstrated in non-septic  
7 situations. In an endotoxinic model, it improved cardiac output, blood pressure and oxygen  
8 transport, even compared to a hypertonic control group (sodium bicarbonates)<sup>25</sup>. Half-molar  
9 lactate in healthy volunteers induced an increase in cardiac output and preload<sup>22</sup>. Its  
10 administration in post-operative cardiac surgery increased cardiac index<sup>18</sup>. There are different  
11 possible mechanisms for these beneficial effects. First, the early and aggressive fluid-  
12 management by a hypertonic fluid may enhance cardiac performance. This is not fully  
13 satisfactory because the use of HSL vs. hypertonic bicarbonates presented similar effects on  
14 cardiac outputs in a previous endotoxinic model<sup>25</sup> and we discussed above the limited  
15 evidence for an enhanced volemia in our model. Second, the intense modulation of  
16 inflammation by HSL may have protected the heart from injuries because proinflammatory  
17 cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , mediate sepsis-induced cardiac dysfunction<sup>42,43</sup>. Third,  
18 the heart changes its metabolic substrate during shock, shifting from free fatty acids to lactate  
19 oxidation, and HSL may supply this important cardiac fuel<sup>44</sup>. Indeed, systemic lactate  
20 deprivation is associated with cardiovascular collapse and early death of animals<sup>45</sup>.

21

## 22 *Renal function*

23 HSL improved renal function with an increase in diuresis and a reduction in urea. Hypertonic  
24 lactate has been previously described as beneficial on kidney function during experimental  
25 endotoxemia<sup>27</sup> and protected animals from thrombosis of glomerular capillaries<sup>26</sup>. HSL

1 contains no chloride and reduced both chloride blood content and ( $\Delta\text{Cl}^-$ ). Chloride excess  
2 participates to kidney injury<sup>46</sup>, notably through effects on the renal blood flow<sup>8</sup>. Moreover, the  
3 GPR81 receptor is expressed in the kidney and suggests a potential specific effect of lactate<sup>47</sup>.

4

#### 5 *Metabolism*

6 Lactate is a major element of bioenergy, at the crossroad of many energetic pathways. It can  
7 produce ATP through its oxidation *via* pyruvate transformation and the citric acid cycle, the  
8 production of ketone bodies, or even neoglucogenesis and further utilization of glucose.  
9 Contrary to glucose, its transport into cells and mitochondria is regulated by a membrane-  
10 transporter independent from insulin<sup>13,19</sup>. Inflammation, and notably sepsis, induces a defect  
11 in glucose utilization through a resistance to insulin and a reduction in neoglucogenesis,  
12 resulting in reduction in glucose availability for tissues<sup>48</sup>. Thus, lactate may be a source of  
13 energy even when glucose utilization is limited by inflammation. We demonstrated that HSL  
14 raised both lactate and pyruvate levels, suggesting that lactate may be a better energy  
15 precursor than glucose in this model<sup>13</sup>. The deprivation of circulating lactate levels has been  
16 described as detrimental for the septic heart<sup>45</sup>, highlighting the key role of this molecule in the  
17 metabolic pathways during sepsis<sup>19</sup>. Ketone bodies acetoacetate and 3-hydroxybutyrate can be  
18 produced from pyruvate-derived acetyl-CoA and provide ATP in various organs, including  
19 the brain and the heart, notably in conditions with reduced cellular availability of oxygen and  
20 glucose. Moreover, they preserve mitochondrial coupling function<sup>49</sup>. 3-hydroxybutyrate has  
21 been demonstrated to improve cardiac systolic function in patients with chronic heart  
22 insufficiency<sup>50</sup>. We demonstrated that HSL rises lactate, pyruvate but also 3-hydroxybutyrate  
23 blood levels. Thus, the observed improvement in cardiac function may also be secondary to  
24 this rise of ketones, because caloric intakes in both NaCl and HSL groups were similar. We  
25 also demonstrated that HSL enhanced glucose blood content, despite the fact that the NaCl

1 group received an additional infusion of dextrose. This is possibly due to the significant rise  
2 in lactate blood level in HSL, resulting in neoglucogenesis from lactate or/and a sparring  
3 effect of glucose utilization because of the oxidation of lactate<sup>13</sup>. To conclude, HSL seems to  
4 be highly beneficial to metabolism during sepsis.

5

6

### 7 *Strengths and Limits*

8 Our study has several limitations. The main one is the absence of a hypertonic control group  
9 because of the high mortality rate in the “hypertonic bicarbonates” group. The reasons are  
10 unclear. Nevertheless, in a previous work, the use of HSL was associated with a better  
11 microcirculation, inflammation and renal function during endotoxemia<sup>25,26</sup> in comparison with  
12 HSB, making it less interesting in our work to carry out this group. Moreover, we discussed  
13 above that the hypertonic nature could not explain all the beneficial effects observed. Another  
14 limitation is the choice of the model studied. Indeed, the transposition of rodent models to  
15 Humans is questionable<sup>28</sup>. Nevertheless, the use of a septic model in rats allowed us to  
16 explore many aspects of organ dysfunction in a standardized model, with a robust  
17 methodology. We also observed improvement of inflammation but we currently cannot assess  
18 if it is the cause of the consequence of the global improvement. Finally, we evoked the  
19 specific effect of HSL through its GPR81 receptor but this hypothesis needs further  
20 explorations.

21

22 In conclusion, the use of hypertonic lactate-containing fluid in an experimental sepsis model  
23 improves microcirculation, capillary leakage, cardiac and renal functions, potentially through  
24 metabolic and inflammatory pathways. Both experimental and humans studies are warranted

- 1 to deepen the mechanisms of sepsis improvement by HSL and the possible transposition to
- 2 clinical sepsis.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

## 1   **References**

- 2   1.     Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing  
3   Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med.* 2017;377:414–417.  
4   2.     Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.*  
5   2013;369:840–851.  
6   3.     Alsous F, Khamiees M, DeGirolamo A, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA.  
7   Negative fluid balance predicts survival in patients with septic shock: a retrospective pilot  
8   study. *Chest.* 2000;117:1749–1754.  
9   4.     Sirvent J-M, Ferri C, Baró A, Murcia C, Lorencio C. Fluid balance in sepsis and septic  
10  shock as a determining factor of mortality. *Am J Emerg Med.* 2015;33:186–189.  
11  5.     Hippensteel JA, Uchimido R, Tyler PD, Burke RC, Han X, Zhang F, McMurtry SA,  
12  Colbert JF, Lindsell CJ, Angus DC, Kellum JA, Yealy DM, Linhardt RJ, Shapiro NI, Schmidt  
13  EP. Intravenous fluid resuscitation is associated with septic endothelial glycocalyx  
14  degradation. *Crit Care.* 2019;23:259.  
15  6.     MacDonald N, Pearse RM. Are we close to the ideal intravenous fluid? *Br J Anaesth.*  
16  2017;119:i63–i71.  
17  7.     Chang R, Holcomb JB. Choice of Fluid Therapy in the Initial Management of Sepsis,  
18  Severe Sepsis, and Septic Shock. *Shock.* 2016;46:17–26.  
19  8.     Wilcox CS. Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J Clin Invest.*  
20  1983;71:726–735.  
21  9.     Chowdhury AH, Cox EF, Francis ST, Lobo DN. A randomized, controlled, double-  
22  blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on  
23  renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. *Ann Surg.*  
24  2012;256:18–24.

- 1 10. Weinberg L, Harris L, Bellomo R, Ierino FL, Story D, Eastwood G, Collins M,  
2 Churilov L, Mount PF. Effects of intraoperative and early postoperative normal saline or  
3 Plasma-Lyte 148® on hyperkalaemia in deceased donor renal transplantation: a double-blind  
4 randomized trial. *Br J Anaesth.* 2017;119:606–615.
- 5 11. Kellum JA, Song M, Almasri E. Hyperchloremic acidosis increases circulating  
6 inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest.* 2006;130:962–967.
- 7 12. Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Effects of hyperchloremic acidosis on arterial  
8 pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest.*  
9 2004;125:243–248.
- 10 13. Garcia-Alvarez M, Marik PE, Bellomo R. sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit*  
11 *Care.* 18:503.
- 12 14. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure.  
13 *Virulence.* 2014;5:66–72.
- 14 15. Lee I, Hüttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute  
15 inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842:1579–1586.
- 16 16. Langley RJ, Tsalik EL, van Velkinburgh JC, Glickman SW, Rice BJ, Wang C, Chen  
17 B, Carin L, Suarez A, Mohny RP, Freeman DH, Wang M, You J, Wulff J, Thompson JW,  
18 Moseley MA, Reisinger S, Edmonds BT, Grinnell B, Nelson DR, Dinwiddie DL, Miller NA,  
19 Saunders CJ, Soden SS, Rogers AJ, Gazourian L, Fredenburgh LE, Massaro AF, Baron RM,  
20 Choi AMK, Corey GR, Ginsburg GS, Cairns CB, Otero RM, Fowler VG, Rivers EP, Woods  
21 CW, Kingsmore SF. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death  
22 in sepsis. *Sci Transl Med.* 2013;5:195ra95.
- 23 17. Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care.*  
24 2006;12:315–321.

- 1 18. Leverve XM, Boon C, Hakim T, Anwar M, Siregar E, Mustafa I. Half-molar sodium-  
2 lactate solution has a beneficial effect in patients after coronary artery bypass grafting.  
3 *Intensive Care Med.* 2008;34:1796–1803.  
4  
5  
6  
7 19. Leverve XM, Mustafa I. Lactate: A key metabolite in the intercellular metabolic  
8 interplay. *Crit Care.* 2002;6:284–285.  
9  
10  
11  
12 20. Wagner F, Radermacher P, Morimatsu H. Hypertonic lactate solutions: a new horizon  
13 for fluid resuscitation? *Intensive Care Med.* 2008;34:1749–1751.  
14  
15  
16  
17 21. Carteron L, Solari D, Patet C, Quintard H, Miroz J-P, Bloch J, Daniel RT, Hirt L,  
18 Eckert P, Magistretti PJ, Oddo M. Hypertonic Lactate to Improve Cerebral Perfusion and  
19 Glucose Availability After Acute Brain Injury. *Crit Care Med.* 2018;46:1649–1655.  
20  
21  
22  
23 22. Nalos M, Kholodniak E, Smith L, Orde S, Ting I, Slama M, Seppelt I, McLean AS,  
24 Huang S. The comparative effects of 3% saline and 0.5M sodium lactate on cardiac function:a  
25 randomised, crossover study in volunteers. *Crit Care Resusc.* 2018;20:124–130.  
26  
27  
28  
29 23. Millet A, Cuisinier A, Bouzat P, Batandier C, Lemasson B, Stupar V, Pernet-Gallay  
30 K, Crespy T, Barbier EL, Payen JF. Hypertonic sodium lactate reverses brain oxygenation  
31 and metabolism dysfunction after traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2018;120:1295–1303.  
32  
33  
34  
35 24. Ichai C, Payen J-F, Orban J-C, Quintard H, Roth H, Legrand R, Francony G, Leverve  
36 XM. Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in  
37 severe traumatic brain injured patients: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med.*  
38 2013;39:1413–1422.  
39  
40  
41  
42 25. Duburcq T, Durand A, Dessein A-F, Vamecq J, Vienne J-C, Dobbelaere D, Mention  
43 K, Douillard C, Maboudou P, Gmyr V, Pattou F, Jourdain M, Tamion F, Poissy J, Mathieu D,  
44 Favory R. Comparison of fluid balance and hemodynamic and metabolic effects of sodium  
45 lactate versus sodium bicarbonate versus 0.9% NaCl in porcine endotoxic shock: a  
46 randomized, open-label, controlled study. *Crit Care.* 2017;21:113.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

- 1 26. Duburcq T, Durand A, Tournoy A, Gnemmi V, Gmyr V, Pattou F, Jourdain M,  
2 Tamion F, Besnier E, Préau S, Parmentier-Decrucq E, Mathieu D, Poissy J, Favory R.  
3 Sodium lactate improves renal microvascular thrombosis compared to sodium bicarbonate  
4 and 0.9% NaCl in a porcine model of endotoxic shock: an experimental randomized open  
5 label controlled study. *Ann Intensive Care*. 2018;8:24.  
6  
7 27. Duburcq T, Favory R, Mathieu D, Hubert T, Mangalaboyi J, Gmyr V, Quintane L,  
8 Maboudou P, Pattou F, Jourdain M. Hypertonic sodium lactate improves fluid balance and  
9 hemodynamics in porcine endotoxic shock. *Crit Care*. 2014;18:467.  
10  
11 28. Kingsley SMK, Bhat BV. Differential Paradigms in Animal Models of Sepsis. *Curr*  
12 *Infect Dis Rep*. 2016;18:26.  
13  
14 29. Su F, Xie K, He X, Orbegozo D, Hosokawa K, Post EH, Donadello K, Taccone FS,  
15 Creteur J, Vincent J-L. The Harmful Effects of Hypertonic Sodium Lactate Administration in  
16 Hyperdynamic Septic Shock. *Shock*. 2016;46:663–671.  
17  
18 30. Coquerel D, Chagnon F, Sainsily X, Dumont L, Murza A, Côté J, Dumaine R, Sarret  
19 P, Marsault É, Salvail D, Auger-Messier M, Lesur O. ELABELA Improves Cardio-Renal  
20 Outcome in Fatal Experimental Septic Shock. *Crit Care Med*. 2017;45:e1139–e1148.  
21  
22 31. Woodcock TE, Woodcock TM. Revised Starling equation and the glycocalyx model  
23 of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid  
24 therapy. *Br J Anaesth*. 2012;108:384–394.  
25  
26 32. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-  
27 induced alterations in vascular permeability. *Crit Care* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 5];19.  
28 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4308932/>  
29  
30 33. Russell JA, Rush B, Boyd J. Pathophysiology of Septic Shock. *Crit Care Clin*.  
31 2018;34:43–61.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

- 1 34. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  
2 beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1223–1234.
- 3 35. Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC, Ngo L, Angus DC,  
4 Aird WC. A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial  
5 growth factor in sepsis. *Shock.* 2008;29:452–457.
- 6 36. Murphy LS, Wickersham N, McNeil JB, Shaver CM, May AK, Bastarache JA, Ware  
7 LB. Endothelial glycocalyx degradation is more severe in patients with non-pulmonary sepsis  
8 compared to pulmonary sepsis and associates with risk of ARDS and other organ dysfunction.  
9 *Ann Intensive Care.* 2017;7:102.
- 10 37. Inkinen N, Pettilä V, Lakkisto P, Kuitunen A, Jukarainen S, Bendel S, Inkinen O, Ala-  
11 Kokko T, Vaara ST, FINNAKI Study Group. Association of endothelial and glycocalyx  
12 injury biomarkers with fluid administration, development of acute kidney injury, and 90-day  
13 mortality: data from the FINNAKI observational study. *Ann Intensive Care.* 2019;9:103.
- 14 38. Frydland M, Ostrowski SR, Møller JE, Hadziselimovic E, Holmvang L, Ravn HB,  
15 Jensen LO, Pettersson AS, Kjaergaard J, Lindholm MG, Johansson PI, Hassager C. Plasma  
16 Concentration of Biomarkers Reflecting Endothelial Cell- and Glycocalyx Damage are  
17 Increased in Patients With Suspected ST-Elevation Myocardial Infarction Complicated by  
18 Cardiogenic Shock. *Shock.* 2018;50:538–544.
- 19 39. Offermanns S. Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends*  
20 *Endocrinol Metab.* 2017;28:227–236.
- 21 40. Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and  
22 pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via  
23 GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology.* 2014;146:1763–1774.

- 1 41. Errea A, Cayet D, Marchetti P, Tang C, Kluza J, Offermanns S, Sirard J-C, Rumbo M.  
2 Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine  
3 Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PLoS ONE*. 2016;11:e0163694.
- 4 42. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha  
5 and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by  
6 human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996;183:949–958.
- 7 43. Tamion F, Bauer F, Richard V, Laude K, Renet S, Slama M, Thuillez C. Myocardial  
8 dysfunction in early state of endotoxemia role of heme-oxygenase-1. *J Surg Res*.  
9 2010;158:94–103.
- 10 44. Kline J, Thornton L, Lopaschuk G, Barbee R, Watts J. Lactate improves cardiac  
11 efficiency after hemorrhagic shock. 2000;14:215–21.
- 12 45. Levy B, Mansart A, Montemont C, Gibot S, Mallie J-P, Regnault V, Lecompte T,  
13 Lacolley P. Myocardial lactate deprivation is associated with decreased cardiovascular  
14 performance, decreased myocardial energetics, and early death in endotoxic shock. *Intensive*  
15 *Care Med*. 2007;33:495–502.
- 16 46. Sen A, Keener CM, Sileanu FE, Foldes E, Clermont G, Murugan R, Kellum JA.  
17 Chloride Content of Fluids Used for Large-Volume Resuscitation Is Associated With  
18 Reduced Survival. *Crit Care Med*. 2017;45:e146–e153.
- 19 47. Wallenius K, Thalén P, Björkman J-A, Johannesson P, Wiseman J, Böttcher G,  
20 Fjellström O, Oakes ND. Involvement of the metabolic sensor GPR81 in cardiovascular  
21 control. *JCI Insight*. 2017;2.
- 22 48. Dhar A, Castillo L. Insulin resistance in critical illness. *Curr Opin Pediatr*.  
23 2011;23:269–274.
- 24 49. Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME  
25 Trial: A “Thrifty Substrate” Hypothesis. *Diabetes Care*. 2016;39:1108–1114.

1 50. Nielsen R, Møller N, Gormsen LC, Tolbod LP, Hansson NH, Sorensen J, Harms HJ,  
2 Frøkiær J, Eiskjaer H, Jespersen NR, Mellemkjaer S, Lassen TR, Pryds K, Bøtker HE,  
3 Wiggers H. Cardiovascular Effects of Treatment With the Ketone Body 3-Hydroxybutyrate in  
4 Chronic Heart Failure Patients. *Circulation*. 2019;139:2129–2141.

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12 **Figure legends:**

13  
14 7 Figure 1: schematic representation of the study design. HSL: CLP: Caecal Ligature and  
15 Punction; Hypertonic Sodium Lactate; NaCl: Sodium Chloride; TTE: transthoracic  
16  
17 8 echocardiography.  
18  
19

20  
21  
22 10

23  
24 11 Figure 2: Mesenteric microcirculation evaluated by laser speckle imaging (n=10/group).  
25  
26 12 Three examples are presented: A) Sham; B) CLP-NaCl; C) CLP-HSL. D) mean ± SD values  
27  
28 13 of perfusion units in the 3 groups. Red symbols represent the value of the presented examples.  
29  
30  
31 14 \*\*\*: p<0.001.

32  
33  
34 15

35  
36 16 Figure 3: Capillary leakage explored using Evans Blue assay (n=5/group) in the Lungs (A),  
37  
38 17 Gut (B), Liver (C), Heart (D) and E) fluid balance . Results are expressed as medians and  
39  
40 18 interquartiles and compared using a kruskall-wallis or Mann-Whitney test. \*: p<0.05, \*\*:  
41  
42 19 p<0.01, \*\*\*: p<0.001.

43  
44  
45  
46 20

47  
48 21 Figure 4: Trans-Thoracic Echocardiography (n=10/group). A) end-diastolic Left-Ventricular  
49  
50 22 diameter; B) E peak velocity / A peak velocity ratio of the mitral flow; C) Shortening fraction  
51  
52 23 evaluated by Time-Movement mode; D) Cardiac output. Examples are presented in the lower  
53  
54 24 part of the figure for the shortening fraction (time-movement image) and Velocity-Time  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

1 Integral (pulse-wave image). Results are presented as median with interquartiles and  
2 compared using a kruskall-wallis test. \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001.

3

4 Figure 5: Plasma levels of cytokines, VEGF-A and Syndecan-1. Results are expressed as  
5 mean ± SD and compared using an ANOVA test. \*:p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001.

6

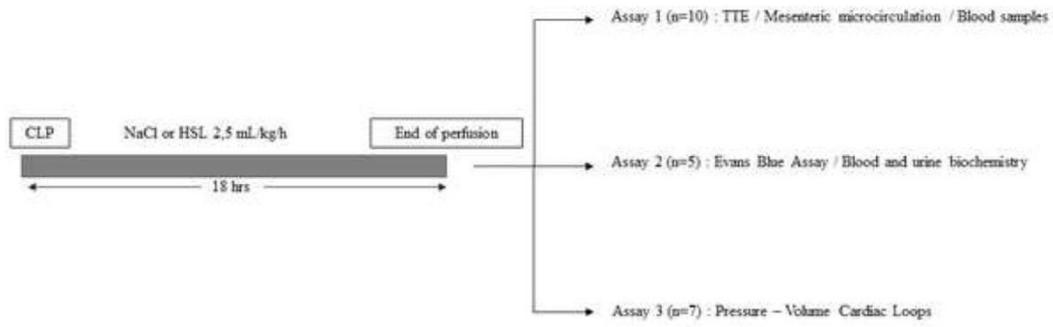
Table 1

	Sham	CLP-NaCl	CLP-HSL	P value	
				NaCl vs. Sham	HSL vs. NaCl
Pulse Pressure (mmHg)	45 [33-48]	22 [19-32]	35 [30-37]	0.006	0.2
Systolic Blood Pressure (mmHg)	120 ± 19	73 ± 23	88 ± 32	0.006	0.5
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	79 ± 13	50 ± 20	55 ± 29	0.03	0.8
LVEDP (mmHg)	2.3 [1.2-4.4]	2.6 [1.7-4.4]	2.8 [1.9-3.6]	0.9	1
LVESP (mmHg)	114 ± 21	68 ± 22	87 ± 32	0.006	0.3
dP/dt max (mmHg/s)	7997 ± 2347	2974 ± 988	7110 ± 4582	0.01	0.04
dP/dt min (mmHg/s)	6492 ± 2045	3079 ± 1503	5489 ± 3564	0.04	0.2
LVESPVR	22 ± 3	21 ± 13	20 ± 3	ns	
LVEDPVR	1.0 ± 0.3	3.2 ± 1.2	1.6 ± 0.8	0.0002	0.005
Tau	8.2 ± 3.1	10.6 ± 1.8	9.5 ± 3.6	ns	

Table 1: Invasive hemodynamic parameters and pressure-volume loops (n=7/group). Results are presented as means ± standard deviations or medians with first and third quartiles according to the normality of the population. Only results of the post-test are presented as numerical data. In case of a non-significant primary test, results are presented as "ns". LVEDP: Left Ventricular End Diastolic Pressure. LVESP: Left Ventricular End Systolic Pressure. LVEDPVR: Left Ventricular End Diastolic Pressure-Volume Relationship. LVESPVR: Left Ventricular End Systolic Pressure-Volume Relationship. Tau: Isovolumic Relaxation Constant. NaCl: sodium-chloride. HSL: hypertonic sodium lactate.

Table 2

	Sham	CLP-NaCl	CLP-HSL	P value	
				Sham vs. NaCl	HSL vs. NaCl
<b>Blood ionogram (n=6)</b>					
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	138 [138-143]	141 [140-143]	153 [150-157]	1	0.02
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.8 [4.5-5.0]	4.7 [4.2-5.2]	3.7 [3.1-4.0]	1	0.02
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	98 [96-99]	100 [99-101]	97 [94-99]	1	0.02
Urea (mmol/L)	6.9 [5.7-8.3]	16.2 [11.3-24.6]	9.6 [8.5-10.7]	<0.0001	0.04
<b>Urine ionogram (n=6)</b>					
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	149 [58-163]	26 [21-39]	441 [362-509]	0.2	0.0004
Na <sup>+</sup> (mmol/day)	2.5 [2.1-2.8]	0.1 [0.1-0.1]	9.9 [8.2-12.5]	0.1	0.0003
Δ Na <sup>+</sup> (mmol)		2.4 [2.4-2.8]	4.9 [2.7-6.2]		0.06
K <sup>+</sup> (mmol/L)	254 [196-282]	325 [295-406]	104 [88-142]	0.2	0.0005
K <sup>+</sup> (mmol/day)	4.6 [3.9-4.8]	1.3 [0.7-2.2]	2.6 [2.0-2.9]	0.001	0.3
Δ K <sup>+</sup> (mmol)		- 1.3 [0.7-2.2]	- 2.6 [2.0-2.9]		
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	185 [143-231]	89 [67-126]	107 [85-137]	0.02	0.8
Cl <sup>-</sup> (mmol/day)	3.4 [2.9-3.7]	0.3 [0.1-0.8]	2.5 [1.9-3.2]	0.002	0.03
Δ Cl <sup>-</sup> (mmol)		2.2 [2.0-2.4]	- 2.5 [1.9-3.2]		0.002
<b>Blood Metabolic parameters (n=10)</b>					
Glucose (mmol/L, n=10)	10.5 ± 2.4	4.9 ± 1.1	9.4 ± 4.5	0.0006	0.002
Lactate (mmol/L)	1.6 ± 1.0	3.5 ± 1.5	6.7 ± 4.6	0.1	0.04
Pyruvate (μmol/L)	32 ± 22	122 ± 51	249 ± 186	0.09	0.03
3-hydroxybutyrate (μmol/L)	514 ± 249	212 ± 105	445 ± 303	0.02	0.03
Acetoacetate (μmol/L)	317 ± 198	149 ± 77	216 ± 137	ns	
<b>Blood Inflammation and capillary leakage parameters (n=10)</b>					
IL-1β (pg/mL)	48 ± 11	993 ± 851	272 ± 215	0.0006	0.004
TNFα (pg/mL)	6 ± 2	59 ± 31	28 ± 23	<0.0001	0.005
IL-10 (pg/mL)	207 ± 29	1015 ± 389	601 ± 523	0.0001	0.02
VEGF-A (pg/mL)	240 [226-280]	261 [250-287]	198 [185-250]	0.4	0.009
Syndecan-1 (pg/mL)	8.5 ± 4.0	9.7 ± 2.6	7.7 ± 2.0	ns	
Table 2 : Biological parameters. Δ ion= ion administrated (mmol) - ion excreted (mmol). NaCl: sodium-chloride. HSL: hypertonic sodium lactate.					



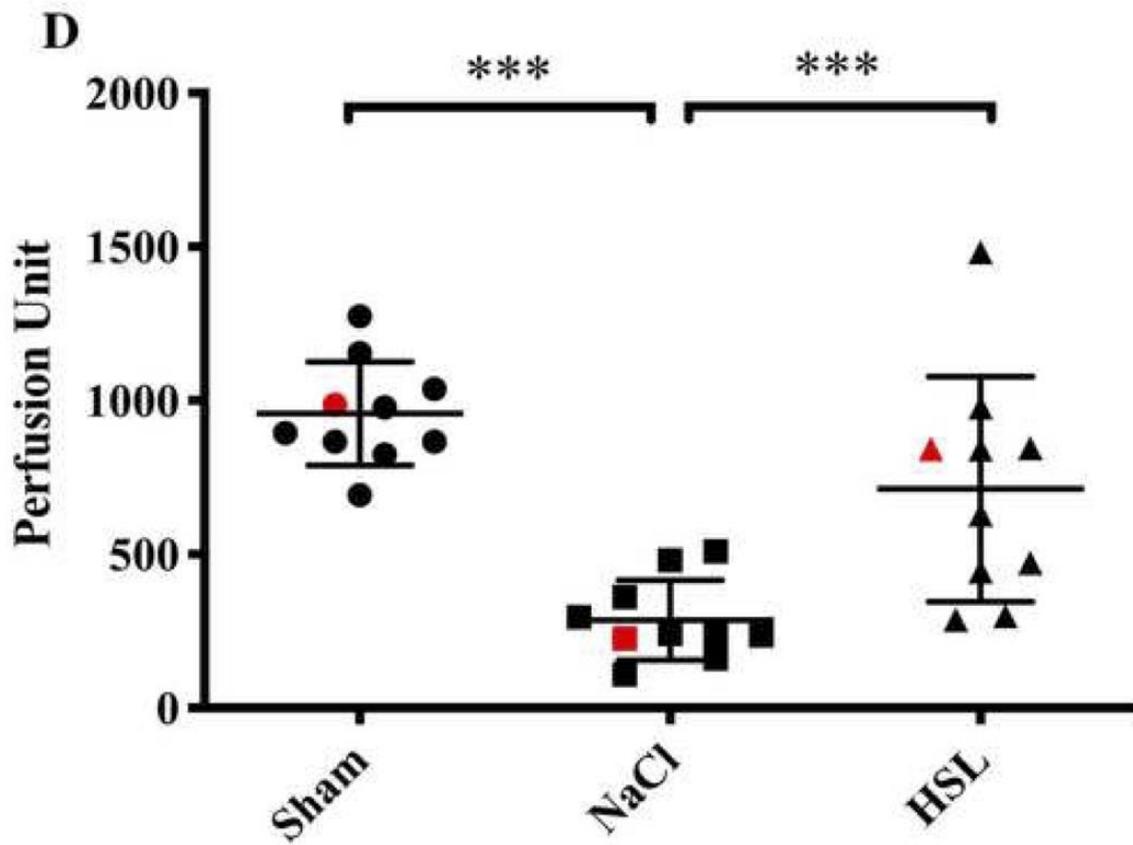
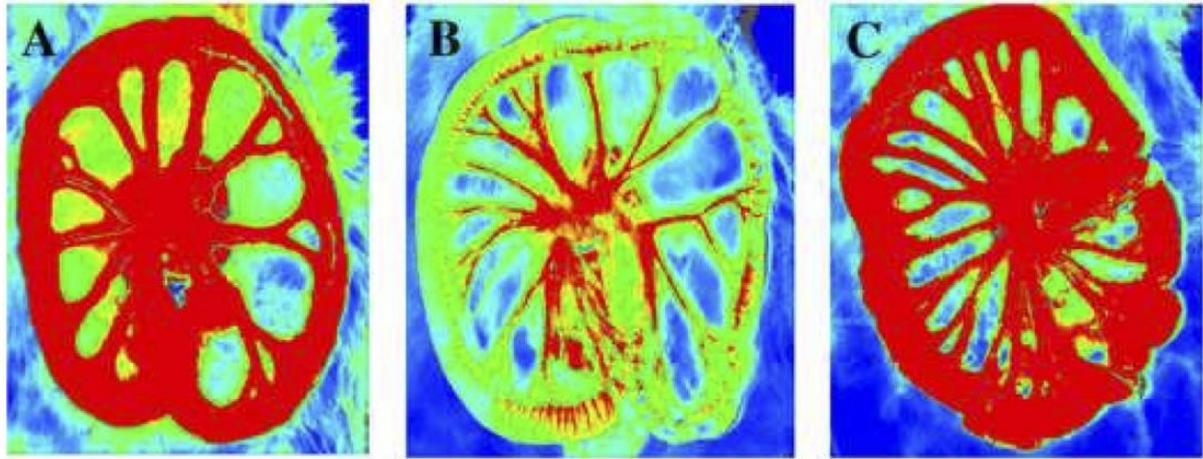


Figure 3

[Click here to download Figure\(s\) figure 3.jpg](#)

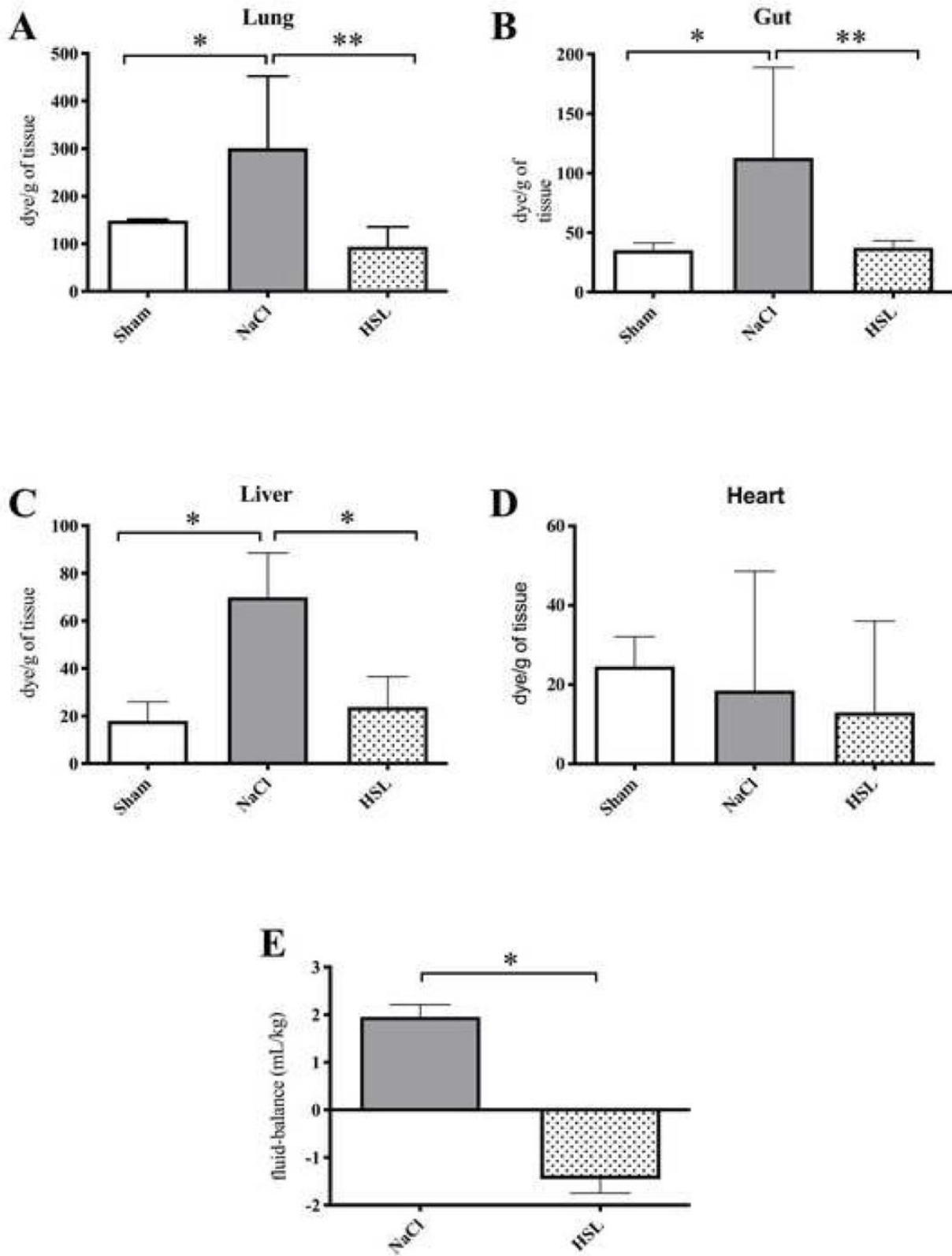
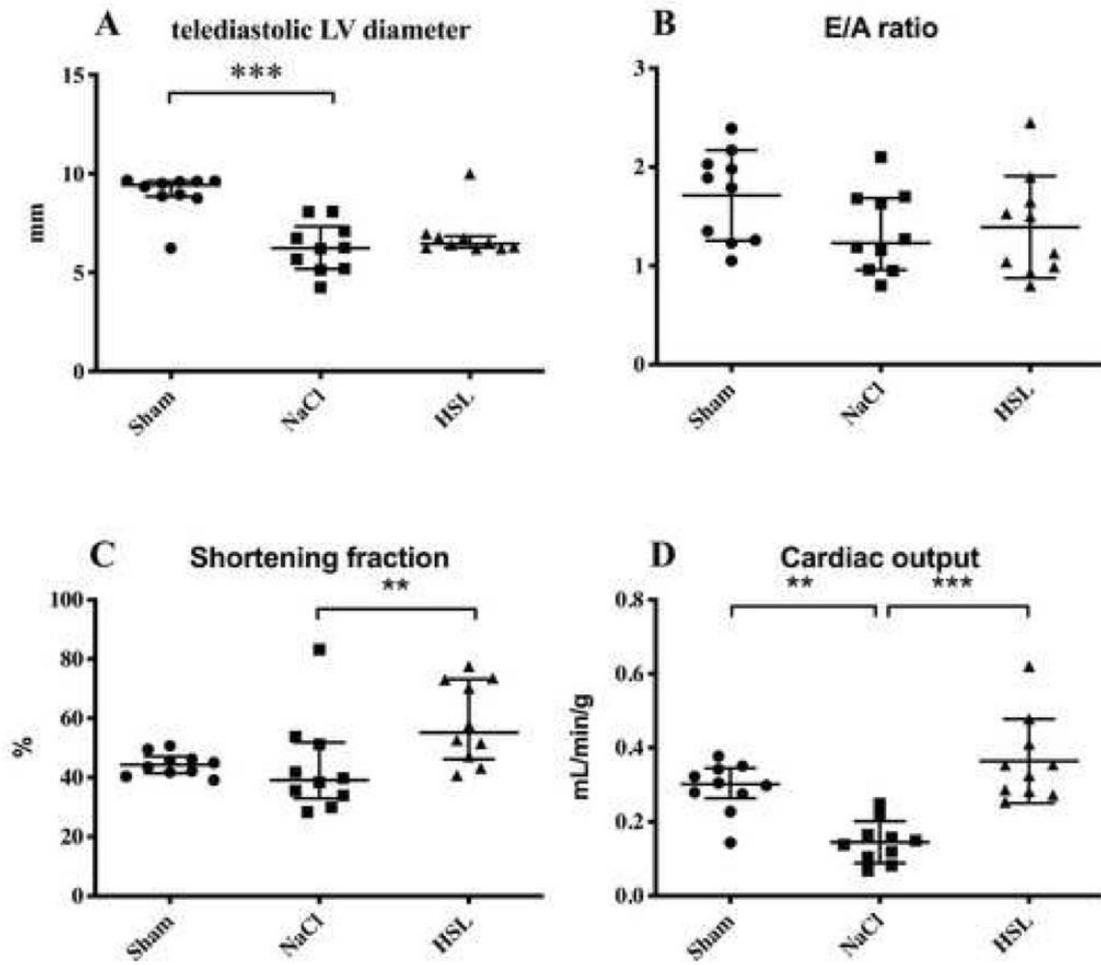


Figure 4

[Click here to download Figure\(s\) figure 4.jpg](#)



NaCl

HSL

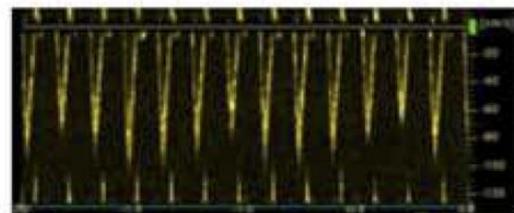
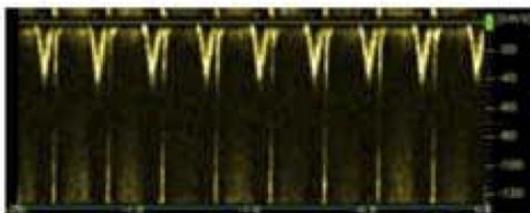
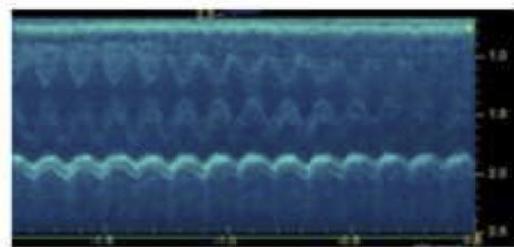
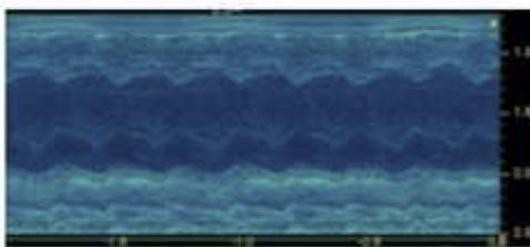
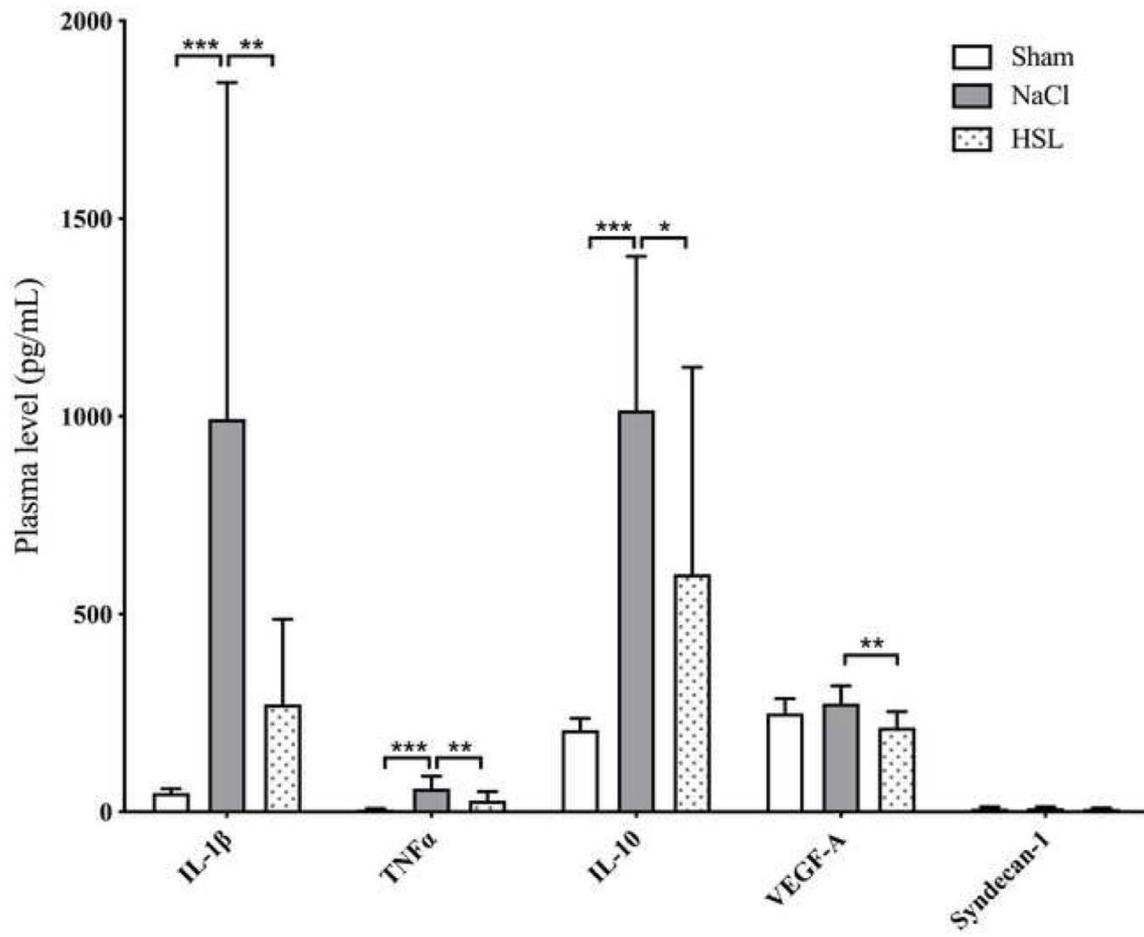


Figure 5

[Click here to download Figure\(s\) figure 5.jpg](#)



## 4. Synthèse générale et perspectives

### 4.1. Balance hydrique au cours du choc non septique

Au cours de ce doctorat nous avons donc confirmé chez l'Homme que l'accumulation de fluides corporels était associée à un mauvais pronostic chez les patients de réanimation les plus sévères.

Dans la première partie de notre travail, portant sur la balance hydrique des patients traités par ECMO veino-artérielle pour choc cardiogénique réfractaire, nous avons pu confirmer les données précédentes de Schmidt *et al* et de Kim *et al* démontrant une association entre mortalité et balance hydrique. Notre travail permet d'outrepasser certains biais des études précédentes. Notre durée d'inclusion était plus faible pour une plus grande homogénéité des pratiques (3 ans versus 10 ans pour l'étude de Kim *et al*). L'analyse de la période initiale avait lieu avant J3 post-ECMO, là où le stress inflammatoire est le plus important (et donc potentiellement la fuite hydrique), alors que Schmidt *et al* avaient exclu ces patients. A la lumière de ces trois études, les patients en chocs cardiogéniques traités par ECMO présentent donc une accumulation hydrique, très probablement secondaire à des mécanismes physiopathologiques proches de ceux du sepsis, et devraient donc bénéficier de stratégies prudentes de gestion des fluides comme celles développées pour le sepsis (cf supra). L'un des principaux écueils à la limitation de l'administration des fluides est l'absence d'outil d'analyse de la précharge dépendance de ces patients. En raison du caractère centrifuge et continu du débit circulatoire généré par l'ECMO, et d'un circuit sanguin en grande partie extracorporel, tous les indices de précharge dépendance, dont ceux basés sur les interactions cœur-poumons, sont inutilisables. Le seul utilisable à ce jour est le *fluid challenge* permettant de restaurer un débit de pompe lorsque celui-ci s'effondre. Les perspectives d'amélioration de la gestion volémique/hydrique de ces patients pourraient donc se baser sur plusieurs axes :

- Limiter le développement du processus inflammatoire propre au circuit d'ECMO, peut-être grâce à l'utilisation de membrane adsorbante de cytokines<sup>287</sup>. Ceci a pour l'instant fait le cas de quelques descriptions cliniques mais aucune étude randomisée n'a exploré leur effet à ce jour. Dans une série de 6 cas, Lothar *et al* utilisèrent le système CytoSorb™ (CytoSorbents Europe) en dérivation sur l'oxygénateur de l'ECMO pour des patients traités par ce dispositif dans le cadre de chocs septiques (n=4) ou d'arrêts cardiaques (n=2)<sup>288</sup>. Les taux d'IL-6 mesurés chez deux patients diminuaient de façon importante (-85%) et chez les 2 patients traités pour arrêt cardiaque la balance hydrique diminuait également. Ce dispositif pourrait donc être d'intérêt pour limiter l'inflammation et ses conséquences délétères sur la fuite capillaire.

- Développer des thérapeutiques ciblant spécifiquement l'endothélium et les acteurs de la fuite capillaire (anti-VEGF, anti-Ang2, augmentation de l'activité phosphatase sous-membranaire...)

- Développer des outils de précharge dépendance adaptés à ces patients afin de limiter les apports inutiles

## 4.2. VEGF et sepsis

Nous avons ensuite testé plusieurs molécules ayant potentiellement un intérêt pour limiter ces phénomènes œdémateux. La première molécule que nous avons testée est l'anticorps anti-VEGF bevacizumab. Son utilisation dans notre modèle s'est avérée un échec. Plusieurs hypothèses ont été soulevées : l'altération des processus de cicatrisation péritonéale (modèle chirurgical de CLP) par inhibition de l'angiogenèse VEGF, ou bien la non-sélectivité du bevacizumab contre le VEGF<sub>165</sub>. En effet cet anticorps cible une portion non spécifique du VEGF, commune à la plupart des variants peptidiques alors même que ceux-ci peuvent avoir des effets antagonistes. Ainsi, si la plupart des effets pro-perméabilisants du VEGF sont dus à son variant VEGF<sub>165a</sub>, le variant VEGF<sub>165b</sub> présente des effets opposés, régulateurs du VEGF<sub>165a</sub> sur la perméabilité capillaire et l'angiogenèse<sup>158</sup>. De plus d'autres variants (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>183</sub>...) exercent des effets pléiotropes d'intérêt. Bloquer de façon non spécifique tous les variants pourrait donc aboutir à l'absence d'effet, voir à des effets délétères. L'absence d'essais cliniques ou de nouvelle publication expérimentale sur le bevacizumab en contexte inflammatoire aigu, en association avec nos propres résultats, interroge sur l'intérêt de cette molécule dans le sepsis. L'utilisation d'anticorps plus spécifiques tel que le pegaptanib, anticorps spécifique du VEGF<sub>165</sub> pourrait être une voie envisagée. Une alternative pourrait également être le blocage combiné des 2 voies de signalisation Ang2 et VEGF, toutes deux fortement impliquées dans la fuite capillaire. Dans une étude expérimentale de sepsis polymicrobien par ligature ponction caecale chez la souris, Hauschildt *et al* ont mis en évidence que l'utilisation d'un anticorps hétérodimérique et bispécifique dirigé contre l'Ang2 et le VEGF (A2V, Roche n°R06872840-000-006) induisait une diminution de l'expression d'ICAM-1 et de l'infiltrat leucocytaire, avec diminution de l'inflammation tissulaire, mais également une amélioration de la perméabilité *in vivo* et dans un modèle cellulaire *in vitro*, et *in fine* une amélioration de 38% de la survie<sup>289</sup>. Ce travail illustre la nécessité de combiner les approches afin d'optimiser les chances de succès, mais illustre également l'interconnexion entre les voies physiopathologiques, puisque l'inhibition de deux voies impliquées dans la fuite capillaire (Ang2/Tie2 et VEGF/VEGF-R) se traduit certes par une diminution de la fuite, mais également par une diminution du recrutement leucocytaire et de sa diapédèse, avec une réduction de l'inflammation. Nous avons détaillé précédemment que le VEGF était impliqué dans la régulation de la phosphorylation des VE-cadhérines et donc de la perméabilité paracellulaire. Nous avons également détaillé d'un côté l'association entre le VEGF ou son récepteur soluble sFlt-1 et la sévérité/mortalité des patients septiques, et d'un autre côté l'association entre balance hydrique et mortalité. Cependant à ce jour aucune étude n'a corrélé l'apparition d'un syndrome œdémateux avec la présence d'une augmentation des taux de VEGF ou de sFlt-1 afin de confirmer leur implication dans ce syndrome. A l'heure de la médecine personnalisée et de l'avènement de la biologie moléculaire au lit du patient, où l'avenir semble être au profilage phénotypique des patients afin de délivrer un traitement ciblé et adapté à la situation, on pourrait

envisager l'administration de thérapies ciblant la voie du VEGF chez des patients présentant des taux élevés. Néanmoins il paraît indispensable de préciser l'implication de ces voies dans la symptomatologie observée. A cette fin, nous réalisons actuellement avec le Dr Boyer (co-investigateur du projet) une étude translationnelle et observationnelle visant à corrélérer les taux de VEGF et sFlt-1 avec l'apparition d'un syndrome œdémateux et d'une dysfonction microcirculatoire. Cette étude prévoit l'inclusion de 100 patients en choc septique au sein des Réanimations Médicale et Chirurgicale du CHU de Rouen. Le syndrome oedémateux est objectivé par la balance hydrique mais également par des mesures de bio-impédancemétrie. La mesure de la microcirculation est réalisée par *Sidestream DarkField Imaging* couplée à l'analyse logicielle de l'épaisseur du glycocalyx (*Peripheral Boundary Region*, glycocheck™, microvision medical USA). Le protocole est présenté annexe 5.

#### 4.3. Impact d'un soluté de lactate de sodium molaire sur la microcirculation, la fuite capillaire et la fonction cardiaque

Le second traitement que nous avons étudié est la perfusion de lactate de sodium. Nous avons montré que la perfusion de lactate de sodium molaire au cours du sepsis expérimental améliorait la microcirculation et la fuite capillaire. Cette amélioration est probablement due à plusieurs mécanismes : diminution de la production de VEGF, réduction du processus inflammatoire, et peut-être aussi par un effet osmotique de la solution. De plus, sa perfusion induisait une amélioration importante de la fonction cardiaque pouvant être due à la fois à la charge sodée, présentant en elle-même des effets tonicardiaques, mais également à l'augmentation du corps cétonique 3-hydroxybutyrate dont nous avons vu précédemment les effets bénéfiques sur le coeur<sup>274</sup>. Un élément important ressortant de ce travail est la métabolisation effective du lactate perfusé. En effet la glycémie est augmentée, témoin de l'utilisation du lactate pour la néoglucogénèse hépatique et rénale (cycle de Cori). De plus, l'augmentation de la production de pyruvate par la lactate deshydrogénase, sans modification du ratio Lactate/Pyruvate, témoigne de l'absence de saturation de cette enzyme. Le pyruvate ainsi formé peut ensuite intégrer le cycle de Krebs dans les tissus à hauts besoins énergétiques (coeur, cerveau) ou aboutir à la formation de corps cétoniques (essentiellement dans le foie) pouvant être secondairement utilisés pour oxydation dans le myocarde. Ce travail démontre donc pour la première fois l'effet bénéfique de la perfusion de lactate de sodium en condition septique, alors que jusqu'à présent les effets bénéfiques avaient été observés uniquement dans des modèles endotoxiques<sup>276-278</sup> et de traumatisme cérébral<sup>275,290</sup>, ou encore chez l'Homme sur la fonction cardiaque<sup>270,271,291</sup>. Les effets bénéfiques observés sur la microcirculation pourraient résulter de trois hypothèses principales. La première reposerait sur la régulation du processus inflammatoire puisque la molécule de lactate peut se fixer sur son récepteur membranaire gpr81 et moduler l'expression du NF-κB<sup>279</sup>. Nous avons décrit précédemment comment le stress inflammatoire pouvait entraîner une fuite capillaire et une dysfonction microcirculatoire. Sa prévention pourrait donc participer à la

préservation de la fonction endothéliale. La deuxième hypothèse pourrait être l'amélioration de la fonction cardiaque et donc de la perfusion globale, limitant l'apparition de stress d'ischémie reperfusion et donc la génération d'espèces réactives de l'oxygène hautement délétère pour l'endothélium<sup>292</sup>. La troisième hypothèse pourrait être une action directe sur la cellule endothéliale par la perfusion de lactate, utilisable pour le métabolisme de cette cellule. S'il est probable que la charge osmotique ait pu participer à la restauration hémodynamique, il est moins évident qu'elle ait pu induire des modifications si importantes des fonctions d'organes étudiées. En effet, dans les travaux de Duburcq *et al*, si l'administration d'HSB (contrôle hypertonique) induisait une amélioration de la fonction cardiaque, l'HSL présentait des effets plus importants sur cette fonction, mais également sur la microcirculation et la balance hydrique. De plus ce soluté était le seul qui induisait une amélioration de l'inflammation, de l'hématose (et donc probablement de la fuite capillaire) et du transport artériel en O<sub>2</sub><sup>277,278</sup>. L'administration de sérum salé hypertonique (NaCl 3%) chez des patients admis au service de d'accueil des urgences pour sepsis ne modifiait pas les taux d'IL-6, IL-8 ou IL-10 comparativement au NaCl 0,9%<sup>293</sup>. Dans une méta-analyse portant sur 381 patients dans 8 essais randomisés, l'utilisation de sérum salé hypertonique ne modifiait pas le pronostic des patients même si cela permettait d'obtenir un profil hémodynamique stable avec un volume moindre<sup>294</sup>.

Toutes ces données plaident donc pour un effet propre de la perfusion de lactate au cours du sepsis mais dont les effets précis nécessitent d'être approfondis. En effet il ne nous a pas été possible de distinguer les effets propres du lactate de sodium sur l'inflammation afin de déterminer qui de la voie inflammatoire ou de la part métabolique présentent un effet notable. A cette fin nous poursuivons actuellement les investigations au sein de l'unité U1096 avec la mesure du métabolisme énergétique et mitochondrial dans le même modèle expérimental de CLP (Master 2 Perrine Leprêtre). Nous explorons la production d'ATP (ratio ATP/ADP), la cinétique des divers métabolites et la structure mitochondriale. Dans un second travail, nous souhaitons explorer spécifiquement l'effet du lactate sur l'endothélium par l'étude de la perméabilité de cultures cellulaires HUVEC exposées à un stress inflammatoire au LPS et mises en contact de concentration croissante de lactate. Un deuxième volet de cette étude endothéliale sera l'exploration de la vasoréactivité *ex vivo* par artériographie au flux d'animaux septiques et exploration des effets *ex vivo* du lactate sur artères isolées. Ceci permettra de bien différencier les effets spécifiques sur la microcirculation ou via une amélioration de la macrocirculation. Ce projet sera développé lors de l'année 2020-2021.

## 5. Conclusion

Pour conclure, l'altération de la fonction barrière endothéliale, ou fuite capillaire, est un élément de mauvais pronostic chez les patients graves de réanimation. L'avènement de nouvelles voies thérapeutiques ciblant ce mécanisme pourrait être d'intérêt mais actuellement aucune n'a fait la preuve de son efficacité chez l'Homme. Les traitements ciblant la voie du VEGF par le bevacizumab sont décevants et nécessitent éventuellement une

autre approche. De façon plus intéressante, la perfusion de lactate permet une amélioration de la fuite capillaire dont les mécanismes nécessitent d'être approfondis mais sont associés à une amélioration globale du métabolisme et de la fonction d'organes. Des études évaluant au mieux ces mécanismes d'action restent nécessaires avant d'évaluer l'impact thérapeutique potentiel de la perfusion de lactate chez le patient agressé.

## 6. Abbreviations

ABP: Actin-Binding Protein

ADAMTS-13: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I repeats 13

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP: Adénosine DiPhosphate

Akt: Protein kinase B

AMPC: Adenosine MonoPhosphate cyclique

AP-1: Activator Protein 1

ARN: Acide RiboNucléique

ARRB2: Arrestin Beta 2

ATP: Adénosine TriPhosphate

BH4: tetrahydrobioptine

CD: Cluster of Differentiation

CDC42: Cell Division Control protein 42

CCL: CC Chemokine Ligand

CLP: Caecal Ligation and Puncture

DAMP: Damage Associated Molecular Pattern

DEP-1: Density-Enhanced Phosphatase – 1

ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

EV: Expansion Volémique

FAD: Flavine Adenine Dinucleotide

FAK: Focal Adhesion Kinase

FT: facteur Tissulaire

FMN: Flavine MonoNucleotide

GMPc: Guanosine MonoPhosphate cyclique

I-  $\kappa$ B: Inhibitor of NF-  $\kappa$ B

ICAM-1: Intracellular Cell Adhesion Molecule-1

IL: Interleukines

INF: Interferon

JAK: Janjus Kinase

JAML: Junctional Adhesion Molecule

LFA-1: Leukocyte Function Antigen - 1

LPS: LipoPolySaccharide

MAPK: Mitogen Associated Protein Kinase

MCT: MonoCarboxylate Transport  
MLC: Myosin Light Chain  
MLCK: Myosin Light Chain Kinase  
mLOC: mitochondrial Lactate Oxidation Complex  
MYD88: Myeloid Differentiation primary response protein 88  
NADP: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NF-  $\kappa$ B: Nuclear Factor  $\kappa$ B  
NO: Monoxyde d'Azote  
NOS: NO Synthase  
NRLP3: NOD-like Receptor Pyrin domain containing 3  
PAI: Plasminogen Activator Inhibitor  
PAM: Pression Artérielle Moyenne  
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern  
PSGL-1: P-selectin Glycoprotein Ligand - 1  
PKA: Protein Kinase A  
PLC: PhosphoLipase C  
PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase  
PRR: Pattern Recognition Receptor  
PTP1B: Protein-Tyrosin Phosphatase - 1B  
RAC-1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
ROCK: Rho-associated protein Kinase  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RL: Ringer Lactate  
SID: Strong Ion Difference  
SIG: Strong Ion Gap  
SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrom  
SHP-2: Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase  
SOFA: Sequential Organ Failure Assessment  
TGF: Transforming Growth Factor  
TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TLR: Tool-Like Receptor  
TSAd: T-cell Specific Adaptator  
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule – 1

VE-Cadherin: Vascular Endothelial Cadherin

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VE-PTP: Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase

VLA-4: Very Late Antigen – 4

vWf: von Willebrandt factor

## 7. References

1. Stiefel M, Shaner A, Schaefer SD: The Edwin Smith Papyrus: the birth of analytical thinking in medicine and otolaryngology. *Laryngoscope* 2006; 116:182–8
2. Majno G: The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis* 1991; 163:937–45
3. Cavaillon J-M, Chrétien F: From septicemia to sepsis 3.0-from Ignaz Semmelweis to Louis Pasteur. *Genes Immun* 2019; 20:371–82
4. Cerra FB: The systemic septic response: multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* 1985; 1:591–607
5. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL: The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101:1481–3
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250–6
7. Freund Y, Lemachatti N, Krastinova E, Van Laer M, Claessens Y-E, Avondo A, Occelli C, Feral-Pierrssens A-L, Truchot J, Ortega M, Carneiro B, Pernet J, Claret P-G, Dami F, Bloom B, Riou B, Beaune S, French Society of Emergency Medicine Collaborators Group: Prognostic Accuracy of Sepsis-3 Criteria for In-Hospital Mortality Among Patients With Suspected Infection Presenting to the Emergency Department. *JAMA* 2017; 317:301–8
8. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Poll T van der, Vincent J-L, Angus DC: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315:801–10
9. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL: Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001; 286:1754–8
10. Kempker JA, Martin GS: The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin Chest Med* 2016; 37:165–79
11. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall J-R, Payen D: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34:344–53
12. Sakr Y, Jaschinski U, Wittebole X, Szakmany T, Lipman J, Namendys-Silva SA, Martin-Loeches I, Leone M, Lupu M-N, Vincent J-L, ICON Investigators: Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5:ofy313
13. Arefian H, Heublein S, Scherag A, Brunkhorst FM, Younis MZ, Moerer O, Fischer D, Hartmann M: Hospital-related cost of sepsis: A systematic review. *J Infect* 2017; 74:107–17
14. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care Trialists: Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193:259–72
15. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S: Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017; 377:414–7
16. Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140:805–20
17. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L: Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16045
18. Denning N-L, Aziz M, Gurien SD, Wang P: DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 2019; 10:2536
19. Negishi H, Taniguchi T, Yanai H: The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10
20. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M: Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* 2013; 27:669–84
21. Frink M, Griensven M van, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, Krettek C, Hildebrand F: IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17:49

22. Esteve E, Castro A, López-Bermejo A, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real J-M: Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2007; 30:939–45
23. Krüttgen A, Rose-John S: Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res* 2012; 32:60–5
24. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80:227–36
25. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J: The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* 2011; 90:484–94
26. Kumar AT, Sudhir U, Punith K, Kumar R, Ravi Kumar VN, Rao MY: Cytokine profile in elderly patients with sepsis. *Indian J Crit Care Med* 2009; 13:74–8
27. Corrêa TD, Pereira AJ, Brandt S, Vuda M, Djafarzadeh S, Takala J, Jakob SM: Time course of blood lactate levels, inflammation, and mitochondrial function in experimental sepsis. *Crit Care* 2017; 21:105
28. Cain DW, Cidlowski JA: Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:233–47
29. Opal SM, DePalo VA: Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117:1162–72
30. Iyer SS, Cheng G: Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32:23–63
31. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC: The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011; 15:R183
32. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:862–74
33. Francois B, Jeannot R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmelé T, Blood T, Morre M, Gregoire A, Mayo GA, Blood J, Durum SK, Sherwood ER, Hotchkiss RS: Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018; 3
34. Venet F, Rimmelé T, Monneret G: Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Crit Care Clin* 2018; 34:97–106
35. Félétou M: The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences, 2011 at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/>>
36. Aird WC: Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100:158–73
37. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D, ADQI XIV Workgroup: THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock* 2016; 45:259–70
38. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER: The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:121–67
39. Kolářová H, Ambrúžová B, Svihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L: Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:694312
40. Golen RF van, Gulik TM van, Heger M: Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:1382–402
41. Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* 2008; 389:79–82
42. Colburn P, Kobayashi E, Buonassisi V: Depleted level of heparan sulfate proteoglycan in the extracellular matrix of endothelial cell cultures exposed to endotoxin. *J Cell Physiol* 1994; 159:121–30
43. Rovas A, Seidel LM, Vink H, Pohlkötter T, Pavenstädt H, Ertmer C, Hessler M, Kümpers P: Association of sublingual microcirculation parameters and endothelial glycocalyx dimensions in resuscitated sepsis. *Crit Care* 2019; 23:260
44. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI: The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit Care* 2019; 23:16

45. Torres Filho IP, Torres LN, Salgado C, Dubick MA: Plasma syndecan-1 and heparan sulfate correlate with microvascular glycocalyx degradation in hemorrhaged rats after different resuscitation fluids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 310:H1468-1478
46. Inkinen N, Pettilä V, Lakkisto P, Kuitunen A, Jukarainen S, Bendel S, Inkinen O, Ala-Kokko T, Vaara ST, FINNAKI Study Group: Association of endothelial and glycocalyx injury biomarkers with fluid administration, development of acute kidney injury, and 90-day mortality: data from the FINNAKI observational study. *Ann Intensive Care* 2019; 9:103
47. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL: Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:1906–9
48. Chang JC: Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease. *Thromb J* 2019; 17:10
49. Nguyen TC, Liu A, Liu L, Ball C, Choi H, May WS, Aboulfatova K, Bergeron AL, Dong J-F: Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica* 2007; 92:121–4
50. Martin K, Borgel D, Lerolle N, Feys HB, Trinquart L, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Legendre P, Diehl J-L, Baruch D: Decreased ADAMTS-13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35:2375–82
51. Ruan QR, Zhang WJ, Hufnagl P, Kaun C, Binder BR, Wojta J: Anisodamine counteracts lipopolysaccharide-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells: contribution of the NF-kappa b pathway. *J Vasc Res* 2001; 38:13–9
52. Iba T, Di Nisio M, Thachil J, Wada H, Asakura H, Sato K, Kitamura N, Saitoh D: Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit Care* 2016; 20:287
53. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373–6
54. Michel T, Li GK, Busconi L: Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6252–6
55. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347:768–70
56. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6:3051–64
57. Nussler AK, Billiar TR: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54:171–8
58. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:522–6
59. Schroeder RA, Kuo PC: Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth Analg* 1995; 81:1052–9
60. Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE: Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery* 1994; 116:439–44; discussion 444-445
61. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79:984–91
62. Boo YC, Jo H: Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2003; 285:C499-508
63. Luiking YC, Engelen MPKJ, Deutz NEP: Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:97–104
64. Tulis DA: Novel therapies for cyclic GMP control of vascular smooth muscle growth. *Am J Ther* 2008; 15:551–64
65. 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. *Crit Care Med* 2006; 34:307–13

66. Nardi GM, Scheschowitsch K, Ammar D, Oliveira SK de, Arruda TB, Assreuy J: Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42:e391-400
67. Lewis SJ, Hoque A, Sandock K, Robertson TP, Bates JN, Kooy NW: Differential effects of peroxynitrite on the function of arginine vasopressin V(1a) receptors and alpha(1)-adrenoceptors in vivo. *Vascul Pharmacol* 2007; 46:24-34
68. Lewis SJ, Hoque A, Walton TM, Kooy NW: Potential role of nitration and oxidation reactions in the effects of peroxynitrite on the function of beta-adrenoceptor sub-types in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005; 518:187-94
69. Benkusky NA, Lewis SJ, Kooy NW: Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol* 1999; 364:151-8
70. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG: Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 2003; 7:359-73
71. Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Feelisch M, Granger DN: Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1111-1117
72. Szabó C, Módis K: Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock* 2010; 34 Suppl 1:4-14
73. Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S: Role of tight junction derangement in the endothelial dysfunction elicited by exogenous and endogenous peroxynitrite and poly(ADP-ribose) synthetase. *Shock* 2002; 18:434-9
74. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S: Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12383-7
75. Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, Salzman AL, Szabó C: The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 1997; 120:259-67
76. Simon JN, Duglan D, Casadei B, Carnicer R: Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 73:80-91
77. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G: Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 2007; 81:779-93
78. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T: Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:14582-6
79. Panas D, Khadour FH, Szabó C, Schulz R: Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1998; 275:H1016-1023
80. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; 368:157-69
81. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-5
82. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R: Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999; 276:H1943-1950
83. Hickey MJ, Granger DN, Kubes P: Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leukocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand* 2001; 173:119-26
84. Hollenberg SM, Guglielmi M, Parrillo JE: Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Crit Care* 2007; 11:R125
85. Dal Secco D, Paron JA, Oliveira SHP de, Ferreira SH, Silva JS, Cunha F de Q: Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 2003; 9:153-64

86. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CMC, Soares MBP, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha F de Q: Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:490–7
87. Thom SR, Bhopale VM, Mancini DJ, Milovanova TN: Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function. *J Biol Chem* 2008; 283:10822–34
88. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, Kubes P: Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 1997; 11:955–64
89. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ: Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 2002; 70:3602–10
90. Lush CW, Cepinskas G, Sibbald WJ, Kvietys PR: Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS-deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G291–297
91. Mehta S: The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol* 2005; 43:390–403
92. Pheng LH, Francoeur C, Denis M: The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 1995; 19:599–610
93. Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S: Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:166–72
94. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA: Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993; 142:1217–26
95. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K: Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 1997; 65:3644–7
96. Wang L, Taneja R, Razavi HM, Law C, Gillis C, Mehta S: Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Shock* 2012; 37:539–47
97. Hu P, Ischiropoulos H, Beckman JS, Matalon S: Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1994; 266:L628–634
98. Fernandes D, Assreuy J: Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock* 2008; 30 Suppl 1:10–3
99. La Mura V, Pasarín M, Rodriguez-Vilarrupla A, García-Pagán JC, Bosch J, Abraldes JG: Liver Sinusoidal Endothelial Dysfunction After LPS Administration: A Role for Inducible-Nitric Oxide Synthase. *J Hepatol* 2014 doi:10.1016/j.jhep.2014.07.014
100. Ishikawa K, Calzavacca P, Bellomo R, Bailey M, May CN: Effect of selective inhibition of renal inducible nitric oxide synthase on renal blood flow and function in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med* 2012; 40:2368–75
101. Filippi M-D: Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* 2019; 133:2149–58
102. Filippi M-D: Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol* 2016; 129:25–53
103. Schuetz P, Jones AE, Aird WC, Shapiro NI: Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. *Shock* 2011; 36:104–8
104. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW: Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol* 2011; 32:461–9
105. Kumar S, Xu J, Perkins C, Guo F, Snapper S, Finkelman FD, Zheng Y, Filippi M-D: Cdc42 regulates neutrophil migration via crosstalk between WASp, CD11b, and microtubules. *Blood* 2012; 120:3563–74
106. Szczur K, Zheng Y, Filippi M-D: The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. *Blood* 2009; 114:4527–37
107. Shulman Z, Shinder V, Klein E, Grabovsky V, Yeger O, Geron E, Montresor A, Bolomini-Vittori M, Feigelson SW, Kirchhausen T, Laudanna C, Shakhar G, Alon R: Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* 2009; 30:384–96

108. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, Fuente MA de la, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA: Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 2007; 26:784–97
109. Carman CV, Jun C-D, Salas A, Springer TA: Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J Immunol* 2003; 171:6135–44
110. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M: Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:366–78
111. Muller WA: Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol* 2013; 50:7–22
112. Mamdouh Z, Chen X, Pierini LM, Maxfield FR, Muller WA: Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 2003; 421:748–53
113. Vestweber D: How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:692–704
114. Millán J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ: Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 2006; 8:113–23
115. Carman CV: Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by “invadosome-like protrusions.” *J Cell Sci* 2009; 122:3025–35
116. Lossinsky AS, Shivers RR: Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol* 2004; 19:535–64
117. Lira A, Pinsky MR: Choices in fluid type and volume during resuscitation: impact on patient outcomes. *Ann Intensive Care* 2014; 4:38
118. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF: Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 2004; 100:1211–23
119. Woodcock TE, Woodcock TM: Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *Br J Anaesth* 2012; 108:384–94
120. Henrich M, Gruss M, Weigand MA: Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalix. *ScientificWorldJournal* 2010; 10:917–23
121. Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E, Weitz J, Hofmann U, Weigand MA: Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalix. *J Surg Res* 2011; 165:136–41
122. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF: Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007; 116:1896–906
123. Sirvent J-M, Ferri C, Baró A, Murcia C, Lorenzo C: Fluid balance in sepsis and septic shock as a determining factor of mortality. *Am J Emerg Med* 2015; 33:186–9
124. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY: Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11:e19
125. Shajahan AN, Timblin BK, Sandoval R, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD: Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279:20392–400
126. Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86:279–367
127. Radeva MY, Waschke J: Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol (Oxf)* 2018; 222
128. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P, McDonald DM: Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* 2009; 335:17–25
129. Rubin LL, Staddon JM: The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:11–28

130. Nelson WJ: Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 2008; 36:149–55
131. Hartsock A, Nelson WJ: Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:660–9
132. Baumgartner W, Schütz GJ, Wiegand J, Golenhofen N, Drenckhahn D: Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116:1001–11
133. Milam KE, Parikh SM: The angiopoietin-Tie2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation. *Tissue Barriers* 2015; 3:e957508
134. Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE: cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H2427-2433
135. Patil SB, Bitar KN: RhoA- and PKC-alpha-mediated phosphorylation of MYPT and its association with HSP27 in colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G83-95
136. Heupel W-M, Efthymiadis A, Schlegel N, Müller T, Baumer Y, Baumgartner W, Drenckhahn D, Waschke J: Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. *J Cell Sci* 2009; 122:1616–25
137. Fahey E, Doyle SL: IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front Immunol* 2019; 10:1426
138. Leligdowicz A, Richard-Greenblatt M, Wright J, Crowley VM, Kain KC: Endothelial Activation: The Ang/Tie Axis in Sepsis. *Front Immunol* 2018; 9:838
139. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML: tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992; 7:1471–80
140. Mammoto T, Parikh SM, Mammoto A, Gallagher D, Chan B, Mostoslavsky G, Ingber DE, Sukhatme VP: Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *J Biol Chem* 2007; 282:23910–8
141. Ghosh CC, David S, Zhang R, Berghelli A, Milam K, Higgins SJ, Hunter J, Mukherjee A, Wei Y, Tran M, Suber F, Kobzik L, Kain KC, Lu S, Santel A, Yano K, Guha P, Dumont DJ, Christiani DC, Parikh SM: Gene control of tyrosine kinase TIE2 and vascular manifestations of infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113:2472–7
142. Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Zakyntinos S, Armaganidis A, Papapetropoulos A, Roussos C: Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med* 2007; 35:199–206
143. Zeng H, He X, Tuo Q-H, Liao D-F, Zhang G-Q, Chen J-X: LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2 $\alpha$ /Notch3 pathways. *Sci Rep* 2016; 6:20931
144. Lukasz A, Hillgruber C, Oberleithner H, Kusche-Vihrog K, Pavenstädt H, Rovas A, Hesse B, Goerge T, Kümpers P: Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2. *Cardiovasc Res* 2017; 113:671–80
145. Scholz A, Plate KH, Reiss Y: Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1347:45–51
146. Fang Y, Li C, Shao R, Yu H, Zhang Q, Zhao L: Prognostic significance of the angiopoietin-2/angiopoietin-1 and angiopoietin-1/Tie-2 ratios for early sepsis in an emergency department. *Crit Care* 2015; 19:367
147. Witzenbichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss H-P, Tschope C: Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005; 111:97–105
148. Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Kang KP, Lee TH, Lee SY, Jang KY, Moon WS, Choi K-S, Yoon K-H, Sung MJ, Park SK, Kim W: COMP-angiopoietin-1 decreases lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2009; 76:1180–91
149. David S, Park J-K, Meurs M van, Zijlstra JG, Koenecke C, Schrimpf C, Shushakova N, Gueler F, Haller H, Kümpers P: Acute administration of recombinant Angiopoietin-1 ameliorates multiple-organ dysfunction syndrome and improves survival in murine sepsis. *Cytokine* 2011; 55:251–9

150. Stiehl T, Thamm K, Kaufmann J, Schaeper U, Kirsch T, Haller H, Santel A, Ghosh CC, Parikh SM, David S: Lung-targeted RNA interference against angiopoietin-2 ameliorates multiple organ dysfunction and death in sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42:e654-662
151. Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, Pfetsch V, Weinmann K, Dietzel S, Rohwedder I, Hinkel R, Gross L, Lee S, Hu J, Soehnlein O, Franz WM, Sperandio M, Pohl U, Thomas M, Weber C, Augustin HG, Fässler R, Deutsch U, Kupatt C: Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. *J Clin Invest* 2013 doi:10.1172/JCI66549
152. Han S, Lee S-J, Kim KE, Lee HS, Oh N, Park I, Ko E, Oh SJ, Lee Y-S, Kim D, Lee S, Lee DH, Lee K-H, Chae SY, Lee J-H, Kim S-J, Kim H-C, Kim S, Kim SH, Kim C, Nakaoka Y, He Y, Augustin HG, Hu J, Song PH, Kim Y-I, Kim P, Kim I, Koh GY: Amelioration of sepsis by TIE2 activation-induced vascular protection. *Sci Transl Med* 2016; 8:335ra55
153. Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, Alcobia DC, Hill SJ, Kilpatrick LE, Woolard J: Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci* 2018; 19
154. Hubbard SR, Till JH: Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:373–98
155. Muller YA, Heiring C, Misselwitz R, Welfle K, Welfle H: The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002; 277:43410–6
156. Bates DO: Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res* 2010; 87:262–71
157. Wu W-K, Llewellyn OPC, Bates DO, Nicholson LB, Dick AD: IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology* 2010; 215:796–803
158. Ourradi K, Blythe T, Jarrett C, Barratt SL, Welsh GI, Millar AB: VEGF isoforms have differential effects on permeability of human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respir Res* 2017; 18:116
159. Sun Z, Li X, Massena S, Kutschera S, Padhan N, Gualandi L, Sundvold-Gjerstad V, Gustafsson K, Choy WW, Zang G, Quach M, Jansson L, Phillipson M, Abid MR, Spurkland A, Claesson-Welsh L: VEGFR2 induces c-*Src* signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd. *J Exp Med* 2012; 209:1363–77
160. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E: Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 2006; 174:593–604
161. Basagiannis D, Christoforidis S: Constitutive Endocytosis of VEGFR2 Protects the Receptor against Shedding. *J Biol Chem* 2016; 291:16892–903
162. Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69 Suppl 3:4–10
163. Rapisarda A, Melillo G: Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv Cancer Res* 2012; 114:237–67
164. Xie Z, Ghosh CC, Patel R, Iwaki S, Gaskins D, Nelson C, Jones N, Greipp PR, Parikh SM, Druey KM: Vascular endothelial hyperpermeability induces the clinical symptoms of Clarkson disease (the systemic capillary leak syndrome). *Blood* 2012; 119:4321–32
165. Lesterhuis WJ, Rennings AJ, Leenders WP, Nooteboom A, Punt CJ, Sweep FC, Pickkers P, Geurts-Moespot A, Van Laarhoven HW, Van der Vlag J, Berden JH, Postma CT, Van der Meer JW: Vascular endothelial growth factor in systemic capillary leak syndrome. *Am J Med* 2009; 122:e5-7
166. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G: A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2020:115327 doi:10.1016/j.bmc.2020.115327
167. Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC, Ngo L, Angus DC, Aird WC: A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock* 2008; 29:452–7
168. Hou PC, Filbin MR, Wang H, Ngo L, Huang DT, Aird WC, Yealy DM, Angus DC, Kellum JA, Shapiro NI, ProCESS Investigators(\*): Endothelial Permeability and Hemostasis in Septic Shock: Results From the ProCESS Trial. *Chest* 2017; 152:22–31

169. Flier M van der, Leeuwen HJ van, Kessel KP van, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP: Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock* 2005; 23:35–8
170. Karlsson S, Pettilä V, Tenhunen J, Lund V, Hovilehto S, Ruokonen E, Finnsepsis Study Group: Vascular endothelial growth factor in severe sepsis and septic shock. *Anesth Analg* 2008; 106:1820–6
171. Yang K-Y, Liu K-T, Chen Y-C, Chen C-S, Lee Y-C, Perng R-P, Feng J-Y: Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 levels predict outcomes of pneumonia-related septic shock patients: a prospective observational study. *Crit Care* 2011; 15:R11
172. Jelkmann W: Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001; 47:617–23
173. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S: Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med* 2016; 374:13–22
174. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, Trzeciak S, Ngo L, Aird WC: The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010; 14:R182
175. Stewart MW: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pre-clinical characteristics of ophthalmic drugs that bind VEGF. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014; 7:167–80
176. Jeong SJ, Han SH, Kim CO, Choi JY, Kim JM: Anti-vascular endothelial growth factor antibody attenuates inflammation and decreases mortality in an experimental model of severe sepsis. *Crit Care* 2013; 17:R97
177. Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD, Sathyanarayana null, Pollock JS, Brock TL, McNeil PL: Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res* 2001; 96:173–82
178. Velde EA te, Voest EE, Gorp JM van, Verheem A, Hagendoorn J, Gebbink MF, Borel Rinkes IH: Adverse effects of the antiangiogenic agent angiostatin on the healing of experimental colonic anastomoses. *Ann Surg Oncol* 2002; 9:303–9
179. Pickkers P, Sprong T, Eijk L van, Hoeven H van der, Smits P, Deuren M van: Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock* 2005; 24:508–12
180. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, et al.: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43:304–77
181. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA: Acute kidney injury. *Lancet* 2019; 394:1949–64
182. Ware LB, Matthay MA: Clinical practice. Acute pulmonary edema. *N Engl J Med* 2005; 353:2788–96
183. Kushimoto S, Endo T, Yamanouchi S, Sakamoto T, Ishikura H, Kitazawa Y, Taira Y, Okuchi K, Tagami T, Watanabe A, Yamaguchi J, Yoshikawa K, Sugita M, Kase Y, Kanemura T, Takahashi H, Kuroki Y, Izumino H, Rinka H, Seo R, Takatori M, Kaneko T, Nakamura T, Irahara T, Saito N, PiCCO Pulmonary Edema Study Group: Relationship between extravascular lung water and severity categories of acute respiratory distress syndrome by the Berlin definition. *Crit Care* 2013; 17:R132
184. National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network, Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, Connors AF, Hite RD, Harabin AL: Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med* 2006; 354:2564–75
185. Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry J-P, Dumesnil A, Boukhalfa I, Banquet S, Schapman D, Thuillez C, Richard V, Mulder P, Brakenhielm E: Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation* 2016; 133:1484–97; discussion 1497

186. 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; 94:400–6
187. Lanspa MJ, Shahul S, Hersh A, Wilson EL, Olsen TD, Hirshberg EL, Grissom CK, Brown SM: Associations among left ventricular systolic function, tachycardia, and cardiac preload in septic patients. *Ann Intensive Care* 2017; 7:17
188. Hippensteel JA, Uchimido R, Tyler PD, Burke RC, Han X, Zhang F, McMurtry SA, Colbert JF, Lindsell CJ, Angus DC, Kellum JA, Yealy DM, Linhardt RJ, Shapiro NI, Schmidt EP: Intravenous fluid resuscitation is associated with septic endothelial glycocalyx degradation. *Crit Care* 2019; 23:259
189. Marik PE, Linde-Zwirble WT, Bittner EA, Sahatjian J, Hansell D: Fluid administration in severe sepsis and septic shock, patterns and outcomes: an analysis of a large national database. *Intensive Care Med* 2017; 43:625–32
190. Byrne L, Obonyo NG, Diab SD, Dunster KR, Passmore MR, Boon A-C, Hoe LS, Pedersen S, Fauzi MH, Pimenta LP, Van Haren F, Anstey CM, Cullen L, Tung J-P, Shekar K, Maitland K, Fraser JF: Unintended Consequences: Fluid Resuscitation Worsens Shock in an Ovine Model of Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198:1043–54
191. Chappell D, Bruegger D, Potzel J, Jacob M, Brettner F, Vogeser M, Conzen P, Becker BF, Rehm M: Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care* 2014; 18:538
192. 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\*. *Crit Care Med* 2014; 42:790–800
193. Besen BAMP, Gobatto ALN, Melro LMG, Maciel AT, Park M: Fluid and electrolyte overload in critically ill patients: An overview. *World J Crit Care Med* 2015; 4:116–29
194. Payen D, Pont AC de, Sakr Y, Spies C, Reinhart K, Vincent JL, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Investigators: A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. *Crit Care* 2008; 12:R74
195. Jaffee W, Hodgins S, McGee WT: Tissue Edema, Fluid Balance, and Patient Outcomes in Severe Sepsis: An Organ Systems Review. *J Intensive Care Med* 2018; 33:502–9
196. Rehm M, Hulde N, Kammerer T, Meidert AS, Hofmann-Kiefer K: State of the art in fluid and volume therapy : A user-friendly staged concept. English version. *Anaesthesist* 2019; 68:1–14
197. Alsous F, Khamiees M, DeGirolamo A, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA: Negative fluid balance predicts survival in patients with septic shock: a retrospective pilot study. *Chest* 2000; 117:1749–54
198. Sakr Y, Rubatto Birri PN, Kotfis K, Nanchal R, Shah B, Kluge S, Schroeder ME, Marshall JC, Vincent J-L, Intensive Care Over Nations Investigators: Higher Fluid Balance Increases the Risk of Death From Sepsis: Results From a Large International Audit. *Crit Care Med* 2017; 45:386–94
199. Neyra JA, Li X, Canepa-Escaro F, Adams-Huet B, Toto RD, Yee J, Hedayati SS, Acute Kidney Injury in Critical Illness Study Group: Cumulative Fluid Balance and Mortality in Septic Patients With or Without Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *Crit Care Med* 2016; 44:1891–900
200. Yeh Y-C, Lee C-T, Wang C-H, Tu Y-K, Lai C-H, Wang Y-C, Chao A, Huang C-H, Cheng Y-J, Chen Y-S, NTUH Center of Microcirculation Medical Research (NCMMR): Investigation of microcirculation in patients with venoarterial extracorporeal membrane oxygenation life support. *Crit Care* 2018; 22:200
201. Chommeloux J, Montero S, Franchineau G, Bréchet N, Hékimian G, Lebreton G, Le Guennec L, Bourcier S, Nieszkowska A, Leprince P, Luyt C-E, Combes A, Schmidt M: Microcirculation Evolution in Patients on Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Refractory Cardiogenic Shock. *Crit Care Med* 2020; 48:e9–17
202. McIlwain RB, Timpa JG, Kurundkar AR, Holt DW, Kelly DR, Hartman YE, Neel ML, Karnatak RK, Schelonka RL, Anantharamaiah GM, Killingsworth CR, Maheshwari A: Plasma concentrations of inflammatory cytokines rise rapidly during ECMO-related SIRS due to the release of preformed stores in the intestine. *Lab Invest* 2010; 90:128–39
203. Al-Fares A, Pettenuzzo T, Del Sorbo L: Extracorporeal life support and systemic inflammation. *Intensive Care Med Exp* 2019; 7:46

204. Schmidt M, Bailey M, Kelly J, Hodgson C, Cooper DJ, Scheinkestel C, Pellegrino V, Bellomo R, Pilcher D: Impact of fluid balance on outcome of adult patients treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Intensive Care Med* 2014; 40:1256–66
205. Kim H, Paek JH, Song JH, Lee H, Jhee JH, Park S, Yun H-R, Kee YK, Han SH, Yoo T-H, Kang S-W, Kim S, Park JT: Permissive fluid volume in adult patients undergoing extracorporeal membrane oxygenation treatment. *Crit Care* 2018; 22:270
206. Vincent J-L: Fluid management in the critically ill. *Kidney Int* 2019; 96:52–7
207. Osman D, Ridel C, Ray P, Monnet X, Anguel N, Richard C, Teboul J-L: Cardiac filling pressures are not appropriate to predict hemodynamic response to volume challenge. *Crit Care Med* 2007; 35:64–8
208. Michard F, Boussat S, Chemla D, Anguel N, Mercat A, Lecarpentier Y, Richard C, Pinsky MR, Teboul JL: Relation between respiratory changes in arterial pulse pressure and fluid responsiveness in septic patients with acute circulatory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:134–8
209. Feissel M, Michard F, Faller J-P, Teboul J-L: The respiratory variation in inferior vena cava diameter as a guide to fluid therapy. *Intensive Care Med* 2004; 30:1834–7
210. Vieillard-Baron A, Chergui K, Rabiller A, Peyrouset O, Page B, Beauchet A, Jardin F: Superior vena caval collapsibility as a gauge of volume status in ventilated septic patients. *Intensive Care Med* 2004; 30:1734–9
211. Monnet X, Rienzo M, Osman D, Anguel N, Richard C, Pinsky MR, Teboul J-L: Passive leg raising predicts fluid responsiveness in the critically ill. *Crit Care Med* 2006; 34:1402–7
212. Myburgh JA, Mythen MG: Resuscitation fluids. *N Engl J Med* 2013; 369:1243–51
213. Starling EH: On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol (Lond)* 1896; 19:312–26
214. Stewart PA: Modern quantitative acid-base chemistry. *Can J Physiol Pharmacol* 1983; 61:1444–61
215. Corey HE: Bench-to-bedside review: Fundamental principles of acid-base physiology. *Critical Care* 2004; 9:184
216. Morgan TJ, Venkatesh B: Designing “balanced” crystalloids. *Crit Care Resusc* 2003; 5:284–91
217. Zornow MH, Prough DS: Fluid management in patients with traumatic brain injury. *New Horiz* 1995; 3:488–98
218. Drobin D, Hahn RG: Volume kinetics of Ringer’s solution in hypovolemic volunteers. *Anesthesiology* 1999; 90:81–91
219. Williams R, Rankin N, Smith T, Galler D, Seakins P: Relationship between the humidity and temperature of inspired gas and the function of the airway mucosa. *Crit Care Med* 1996; 24:1920–9
220. Takil A, Eti Z, Irmak P, Yilmaz Göğüş F: Early postoperative respiratory acidosis after large intravascular volume infusion of lactated ringer’s solution during major spine surgery. *Anesth Analg* 2002; 95:294–8, table of contents
221. O’Malley CMN, Frumento RJ, Hardy MA, Benvenisty AI, Brentjens TE, Mercer JS, Bennett-Guerrero E: A randomized, double-blind comparison of lactated Ringer’s solution and 0.9% NaCl during renal transplantation. *Anesth Analg* 2005; 100:1518–24, table of contents
222. Weinberg L, Pearce B, Sullivan R, Siu L, Scurrah N, Tan C, Backstrom M, Nikfarjam M, McNicol L, Story D, Christophi C, Bellomo R: The effects of plasmalyte-148 versus hartmann’s solution during major liver resection: a multicentre, double-blind, randomized controlled trial. *Minerva Anesthesiol* 2014
223. Hadimioglu N, Saadawy I, Saglam T, Ertug Z, Dinckan A: The effect of different crystalloid solutions on acid-base balance and early kidney function after kidney transplantation. *Anesth Analg* 2008; 107:264–9
224. Weinberg L, Harris L, Bellomo R, Ierino FL, Story D, Eastwood G, Collins M, Churilov L, Mount PF: Effects of intraoperative and early postoperative normal saline or Plasma-Lyte 148® on hyperkalaemia in deceased donor renal transplantation: a double-blind randomized trial. *Br J Anaesth* 2017; 119:606–15
225. Wilcox CS: Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J Clin Invest* 1983; 71:726–35
226. Schnermann J, Ploth DW, Hermle M: Activation of tubulo-glomerular feedback by chloride transport. *Pflugers Arch* 1976; 362:229–40

227. Hashimoto S, Kawata T, Schnermann J, Koike T: Chloride channel blockade attenuates the effect of angiotensin II on tubuloglomerular feedback in WKY but not spontaneously hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27:35–42
228. Chowdhury AH, Cox EF, Francis ST, Lobo DN: A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. *Ann Surg* 2012; 256:18–24
229. Yunos NM, Bellomo R, Hegarty C, Story D, Ho L, Bailey M: Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA* 2012; 308:1566–72
230. Sen A, Keener CM, Sileanu FE, Foldes E, Clermont G, Murugan R, Kellum JA: Chloride Content of Fluids Used for Large-Volume Resuscitation Is Associated With Reduced Survival. *Crit Care Med* 2017; 45:e146–53
231. Semler MW, Wanderer JP, Ehrenfeld JM, Stollings JL, Self WH, Siew ED, Wang L, Byrne DW, Shaw AD, Bernard GR, Rice TW, SALT Investigators \* and the Pragmatic Critical Care Research Group, SALT Investigators: Balanced Crystalloids versus Saline in the Intensive Care Unit. The SALT Randomized Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195:1362–72
232. Semler MW, Self WH, Wanderer JP, Ehrenfeld JM, Wang L, Byrne DW, Stollings JL, Kumar AB, Hughes CG, Hernandez A, Guillaumondegui OD, May AK, Weavind L, Casey JD, Siew ED, Shaw AD, Bernard GR, Rice TW: Balanced Crystalloids versus Saline in Critically Ill Adults. *N Engl J Med* 2018; 378:829–39
233. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, Wang L, Byrne DW, Collins SP, Slovis CM, Lindsell CJ, Ehrenfeld JM, Siew ED, Shaw AD, Bernard GR, Rice TW, SALT-ED Investigators: Balanced Crystalloids versus Saline in Noncritically Ill Adults. *N Engl J Med* 2018; 378:819–28
234. Shaw AD, Bagshaw SM, Goldstein SL, Scherer LA, Duan M, Schermer CR, Kellum JA: Major complications, mortality, and resource utilization after open abdominal surgery: 0.9% saline compared to Plasma-Lyte. *Ann Surg* 2012; 255:821–9
235. Scheingraber S, Rehm M, Sehmisch C, Finsterer U: Rapid saline infusion produces hyperchloremic acidosis in patients undergoing gynecologic surgery. *Anesthesiology* 1999; 90:1265–70
236. Cho YS, Lim H, Kim SH: Comparison of lactated Ringer's solution and 0.9% saline in the treatment of rhabdomyolysis induced by doxylamine intoxication. *Emerg Med J* 2007; 24:276–80
237. Mahler SA, Conrad SA, Wang H, Arnold TC: Resuscitation with balanced electrolyte solution prevents hyperchloremic metabolic acidosis in patients with diabetic ketoacidosis. *Am J Emerg Med* 2011; 29:670–4
238. Van Zyl DG, Rheeder P, Delport E: Fluid management in diabetic-acidosis--Ringer's lactate versus normal saline: a randomized controlled trial. *QJM* 2012; 105:337–43
239. Kellum JA: Fluid resuscitation and hyperchloremic acidosis in experimental sepsis: improved short-term survival and acid-base balance with Hextend compared with saline. *Crit Care Med* 2002; 30:300–5
240. Kellum JA, Song M, Venkataraman R: Effects of hyperchloremic acidosis on arterial pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest* 2004; 125:243–8
241. Kellum JA, Song M, Almasri E: Hyperchloremic acidosis increases circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest* 2006; 130:962–7
242. Shaw AD, Schermer CR, Lobo DN, Munson SH, Khangulov V, Hayashida DK, Kellum JA: Impact of intravenous fluid composition on outcomes in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care* 2015; 19:334
243. Huang L, Zhou X, Yu H: Balanced crystalloids vs 0.9% saline for adult patients undergoing non-renal surgery: A meta-analysis. *Int J Surg* 2018; 51:1–9
244. Waters JH, Gottlieb A, Schoenwald P, Popovich MJ, Sprung J, Nelson DR: Normal saline versus lactated Ringer's solution for intraoperative fluid management in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair: an outcome study. *Anesth Analg* 2001; 93:817–22
245. Orbegozo Cortés D, Rayo Bonor A, Vincent JL: Isotonic crystalloid solutions: a structured review of the literature. *Br J Anaesth* 2014; 112:968–81

246. Wu BU, Hwang JQ, Gardner TH, Repas K, Delee R, Yu S, Smith B, Banks PA, Conwell DL: Lactated Ringer's solution reduces systemic inflammation compared with saline in patients with acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:710-717.e1
247. Choosakul S, Harinwan K, Chirapongsathorn S, Opuchar K, Sanpajit T, Piyanirun W, Puttapitakpong C: Comparison of normal saline versus Lactated Ringer's solution for fluid resuscitation in patients with mild acute pancreatitis, A randomized controlled trial. *Pancreatol* 2018 doi:10.1016/j.pan.2018.04.016
248. Kellum JA, Song M, Li J: Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R686-692
249. Semler MW, Kellum JA: Balanced Crystalloid Solutions. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 199:952–60
250. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, Glass P, Lipman J, Liu B, McArthur C, McGuinness S, Rajbhandari D, Taylor CB, Webb SAR, CHEST Investigators, Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group: Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med* 2012; 367:1901–11
251. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Åneman A, Madsen KR, Møller MH, Elkjær JM, Poulsen LM, Bendtsen A, Winding R, Steensen M, Berezowicz P, Sjøe-Jensen P, Bestle M, Strand K, Wiis J, White JO, Thornberg KJ, Quist L, Nielsen J, Andersen LH, Holst LB, Thormar K, Kjældgaard A-L, Fabritius ML, Mondrup F, Pott FC, Møller TP, et al.: Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med* 2012; 367:124–34
252. hea\_sapub\_ct13550\_ct13279\_ct12815.pdf at <[https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-02/hea\\_sapub\\_ct13550\\_ct13279\\_ct12815.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-02/hea_sapub_ct13550_ct13279_ct12815.pdf)>
253. Futier E, Garot M, Godet T, Biais M, Verzilli D, Ouattara A, Huet O, Lescot T, Lebuffe G, Dewitte A, Cadic A, Restoux A, Asehnoune K, Paugam-Burtz C, Cuvillon P, Faucher M, Vaisse C, El Amine Y, Beloeil H, Leone M, Noll E, Piriou V, Lasocki S, Bazin J-E, Pereira B, Jaber S, FLASH Trial Group, Lasocki S, Huet O, Cadic A, et al.: Effect of Hydroxyethyl Starch vs Saline for Volume Replacement Therapy on Death or Postoperative Complications Among High-Risk Patients Undergoing Major Abdominal Surgery: The FLASH Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020; 323:225–36
254. Martin GS, Bassett P: Crystalloids vs. colloids for fluid resuscitation in the Intensive Care Unit: A systematic review and meta-analysis. *J Crit Care* 2019; 50:144–54
255. Lewis SR, Pritchard MW, Evans DJ, Butler AR, Alderson P, Smith AF, Roberts I: Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 8:CD000567
256. Caironi P, Tognoni G, Masson S, Fumagalli R, Pesenti A, Romero M, Fanizza C, Caspani L, Faenza S, Grasselli G, Iapichino G, Antonelli M, Parrini V, Fiore G, Latini R, Gattinoni L, ALBIOS Study Investigators: Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N Engl J Med* 2014; 370:1412–21
257. Levy B: Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:315–21
258. Brooks GA: The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 2018; 27:757–85
259. Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, Bier DM, Gerich JE: Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *Am J Physiol* 1990; 259:E677-684
260. 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:E555-561
261. Van Hall G: Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* 2000; 168:643–56
262. Hashimoto T, Brooks GA: Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40:486–94
263. Brooks GA: Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol (Lond)* 2009; 587:5591–600
264. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R: Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care* 2014; 18:503
265. Bergman BC, Tsvetkova T, Lowes B, Wolfel EE: Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *J Physiol (Lond)* 2009; 587:2087–99
266. Stanley WC: Myocardial lactate metabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23:920–4

267. Kline J, Thornton L, Lopaschuk G, Barbee R, Watts J: Lactate improves cardiac efficiency after hemorrhagic shock 2000; 14:215–21
268. Barbee RW, Kline JA, Watts JA: Depletion of lactate by dichloroacetate reduces cardiac efficiency after hemorrhagic shock. *Shock* 2000; 14:208–14
269. Levy B, Mansart A, Montemont C, Gibot S, Mallie J-P, Regnault V, Lecompte T, Lacolley P: Myocardial lactate deprivation is associated with decreased cardiovascular performance, decreased myocardial energetics, and early death in endotoxic shock. *Intensive Care Med* 2007; 33:495–502
270. Nalos M, Kholodniak E, Smith L, Orde S, Ting I, Slama M, Seppelt I, McLean AS, Huang S: The comparative effects of 3% saline and 0.5M sodium lactate on cardiac function:a randomised, crossover study in volunteers. *Crit Care Resusc* 2018; 20:124–30
271. Nalos M, Leverve X, Huang S, Weisbrodt L, Parkin R, Seppelt I, Ting I, Mclean A: Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: a pilot randomised controlled clinical trial. *Crit Care* 2014; 18:R48
272. Kline JA, Thornton LR, Lopaschuk GD, Barbee RW, Watts JA: Lactate improves cardiac efficiency after hemorrhagic shock. *Shock* 2000; 14:215–21
273. Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, Koves T, Gardell SJ, Krüger M, Hoppel CL, Lewandowski ED, Crawford PA, Muoio DM, Kelly DP: The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel. *Circulation* 2016; 133:698–705
274. Nielsen R, Møller N, Gormsen LC, Tolbod LP, Hansson NH, Sorensen J, Harms HJ, Frøkiær J, Eiskjaer H, Jespersen NR, Mellekjær S, Lassen TR, Pryds K, Bøtker HE, Wiggers H: Cardiovascular Effects of Treatment With the Ketone Body 3-Hydroxybutyrate in Chronic Heart Failure Patients. *Circulation* 2019; 139:2129–41
275. Millet A, Cuisinier A, Bouzat P, Batandier C, Lemasson B, Stupar V, Pernet-Gallay K, Crespy T, Barbier EL, Payen JF: Hypertonic sodium lactate reverses brain oxygenation and metabolism dysfunction after traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2018; 120:1295–303
276. Duburcq T, Favory R, Mathieu D, Hubert T, Mangalaboyi J, Gmyr V, Quintane L, Maboudou P, Pattou F, Jourdain M: Hypertonic sodium lactate improves fluid balance and hemodynamics in porcine endotoxic shock. *Crit Care* 2014; 18:467
277. Duburcq T, Durand A, Dessein A-F, Vamecq J, Vienne J-C, Dobbelaere D, Mention K, Douillard C, Maboudou P, Gmyr V, Pattou F, Jourdain M, Tamion F, Poissy J, Mathieu D, Favory R: Comparison of fluid balance and hemodynamic and metabolic effects of sodium lactate versus sodium bicarbonate versus 0.9% NaCl in porcine endotoxic shock: a randomized, open-label, controlled study. *Crit Care* 2017; 21:113
278. Duburcq T, Durand A, Tournoy A, Gnemmi V, Gmyr V, Pattou F, Jourdain M, Tamion F, Besnier E, Préau S, Parmentier-Decrucq E, Mathieu D, Poissy J, Favory R: Sodium lactate improves renal microvascular thrombosis compared to sodium bicarbonate and 0.9% NaCl in a porcine model of endotoxic shock: an experimental randomized open label controlled study. *Ann Intensive Care* 2018; 8:24
279. Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ: Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology* 2014; 146:1763–74
280. Nolt B, Tu F, Wang X, Ha T, Winter R, Williams DL, Li C: Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock* 2018; 49:120–5
281. Su F, Xie K, He X, Orbegozo D, Hosokawa K, Post EH, Donadello K, Taccone FS, Creteur J, Vincent J-L: The Harmful Effects of Hypertonic Sodium Lactate Administration in Hyperdynamic Septic Shock. *Shock* 2016; 46:663–71
282. Besnier E, Boubèche S, Clavier T, Popoff B, Dureuil B, Doguet F, Gay A, Veber B, Tamion F, Compère V: Early Positive Fluid Balance is Associated with Mortality In Patients Treated with Venous-Arterial Extra Corporeal Membrane Oxygenation For Cardiogenic Shock: A Retrospective Cohort Study. *Shock* 2019 doi:10.1097/SHK.0000000000001381
283. Besnier E, Brakenhielm E, Richard V, Tamion F: Does anti-VEGF bevacizumab improve survival in experimental sepsis? *Crit Care* 2017; 21:163

284. Zhang H, Huang Z, Zou X, Liu T: Bevacizumab and wound-healing complications: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget* 2016; 7:82473–81
285. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF: Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001; 33:77–9
286. Coquerel D, Chagnon F, Sainsily X, Dumont L, Murza A, Côté J, Dumaine R, Sarret P, Marsault É, Salvail D, Auger-Messier M, Lesur O: ELABELA Improves Cardio-Renal Outcome in Fatal Experimental Septic Shock. *Crit Care Med* 2017; 45:e1139–48
287. Datzmann T, Träger K: Extracorporeal membrane oxygenation and cytokine adsorption. *J Thorac Dis* 2018; 10:S653–60
288. Lothar A, Benk C, Staudacher DL, Supady A, Bode C, Wengenmayer T, Duerschmied D: Cytokine Adsorption in Critically Ill Patients Requiring ECMO Support. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6:71
289. Hauschildt J, Schrimpf C, Thamm K, Retzlaff J, Idowu TO, Kaisenberg C von, Haller H, David S: Dual Pharmacological Inhibition of Angiopoietin-2 and VEGF-A in Murine Experimental Sepsis. *J Vasc Res* 2020; 57:34–45
290. Ichai C, Payen J-F, Orban J-C, Quintard H, Roth H, Legrand R, Francony G, Leverve XM: Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med* 2013; 39:1413–22
291. Leverve XM, Boon C, Hakim T, Anwar M, Siregar E, Mustafa I: Half-molar sodium-lactate solution has a beneficial effect in patients after coronary artery bypass grafting. *Intensive Care Med* 2008; 34:1796–803
292. Singer G, Stokes KY, Neil Granger D: Reactive oxygen and nitrogen species in sepsis-induced hepatic microvascular dysfunction. *Inflamm Res* 2013; 62:155–64
293. Smart L, Macdonald SPJ, Bosio E, Fatovich D, Neil C, Arendts G: Bolus therapy with 3% hypertonic saline or 0.9% saline in emergency department patients with suspected sepsis: A pilot randomised controlled trial. *J Crit Care* 2019; 52:33–9
294. Orbegozo D, Vincent J-L, Creteur J, Su F: Hypertonic Saline in Human Sepsis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Anesth Analg* 2019; 128:1175–84

## 8. Curriculum Vitae et autres publications

### DIPLOMES

- Master 2 Recherche biologie, Université de Rouen 2012
- DES d'Anesthésie-Réanimation 2013
- DESC de Réanimation 2015
- Capacité de formateur à la simulation haute-fidélité 2014
- DIU pédagogie des sciences médicales 2016-2018

### FONCTIONS HOSPITALIERES

- 2013-2015 : Chef de Clinique Assistant – Anesthésie-Réanimation CHU de Rouen
- 2015-2019 : Praticien Hospitalier – Anesthésie-Réanimation CHU de Rouen, Secteur de chirurgie cardiaque
- 2019 : Maître de conférence Universitaire – Praticien Hospitalier – Anesthésie-Réanimation CHU de Rouen, Secteur de chirurgie cardiaque
  - Responsable de l'unité fonctionnelle en chirurgie cardiaque (Anesthésie et Réanimation)

### PUBLICATIONS

- Articles originaux :
  - **E Besnier**, A Perdrix, Gillibert A *et al* Post-operative Hunger after outpatient surgery in patients anesthetized with propofol versus sevoflurane : A randomized controlled study. *Can J Anesth* 2020
  - Demailly Z, Brulard G, Selim J, Compere V, **Besnier E**, Clavier T. Gender differences in professional social media use among anaesthesia researchers. *Br J Anaesth* 2020
  - Franchina S, **Besnier E**, Veber B *et al* Enseignement de la consultation préanesthésique : enquête nationale auprès des internes et des enseignants. *Anesth Reanim* 2019
  - Clavier T, Grangé S, Pressat-Laffouilhère T, **Besnier E et al** Gene Expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Endoplasmic Reticulum Stress During Septic Shock. *Front Med* 2019
  - Clavier T, **Besnier E\***, Maucotel J *et al*. Urantide improves cardiac function, modulates systemic cytokine response and increases survival in a murine sepsis model of endotoxin shock. *Shock Augusta* 2019.
  - **Besnier E**, Hobeika S, Nseir S *et al*. High Flow Nasal Cannula Therapy: Clinical Practice in intensive care units. *Ann Intensive Care* 2019
  - Clavier T, Franchina S, Lefevre-Scelles A, Gouin P, **Besnier E**, Veber B. A protocol to set up needle-free connector with positive displacement in intensive care units. *J Vis Exp* 2019
  - **Besnier E**, Boubech S, Clavier T, Popoff B, Veber B, Gay A, Doguet F, Dureuil B, Tamion F, Compere V. Early positive fluid balance is associated with mortality in patients treated with Venous-Arterial Extra Corporeal Membrane Oxygenation for cardiogenic shock: a retrospective cohort study. *Shock Augusta* 2019
  - Clavier T, Ramen J, Dureuil B, Veber B, Hanouz JL, Dupont H, Lebuffe G, **Besnier E**, Compère V. Use of WhatsApp as an e-learning method for anesthesiology residents teaching : a controlled, multicenter, randomized study. *JMIR mHealth and uHealth* 2019
  - Kimmoun A, Oulehri W, Sonnevill R, Grisot PH, Zogheib E, Amour J, Aissaoui N, Megarbane B, Mongardon N, Renou A, Schmidt M, **Besnier E**, Delmas C, Dessertaine G, Guidon C, Nessler N, Labro G, Rozec B, Pierrot M, Helms J, Bougon D, Chardonnal L, Medard A, Ouattara A, Girerd N, Lamiral Z, Borie M, Ajzenberg N, Levy B. Prevalence and outcome of heparin-induced thrombocytopenia diagnosed under veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: a retrospective nationwide study. *Intensive Care Med* 2018; 44:1460-69
  - **Besnier E**, Clavier T, Tonon MC, Pelletier G, Castel H, Compère V. Anesthetic drugs modulate feeding behavior and hypothalamic expression of the POMC polypeptide precursor and the NPY neuropeptide. *BMC Anesthesiol* 2018

- Duburcq T, Durand A, Tournoys A, Gnemmi V, Gmyr V, Pattou F, Jourdain M, Tamion F, **Besnier E**, Préau S, Parmentier-Decrucq E, Mathieu D, Poissy J, Favory R. Sodium lactate improves renal microvascular thrombosis compared to sodium bicarbonate and 0.9% NaCl in a porcine model of endotoxic shock: an experimental randomized open label controlled study. *Ann Intensive Care* 2018 ; 8 :24.
- Montero S, Aissaoui N, Tadié JM, Bizouarn P, Scherrer V, Persichini R, Delmas C, Rolle F, **Besnier E**, Le Guyader A, Combes A, Schmidt M. Fulminant giant-cell myocarditis on mechanical circulatory support: Management and outcomes of a French multicentre cohort. *Int J Cardiol* 2018 ;253 :105-112.
- **Besnier E**, Brakenhielm E, Richard V, Tamion F, Does anti-VEGF Bevacizumab improve survival in experimental sepsis? *Crit Care* 2017;21:163
- **Besnier E**, Clavier T, Tonon MC et al, Ketamine and etomidate induce downregulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in an endotoxemic mouse model *Anesthesiology* 2017;127:347-54
- **Besnier E**, Guernon K, Bubenheim M et al, Preoxygenation with high flow nasal cannula oxygen therapy and non-invasive ventilation for intubation in the intensive care unit. *Int Care Med* 2016;42:1291-2
- Clavier T, **Besnier E**, Lefevre-Scelles A. et al Increased hypothalamic levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors in rat model of sepsis. *Shock* 2016;45:653-9
- Grangé S, Buchonnet G, **Besnier E** et al, the use of ferritin to identify critically ill patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Crit Care Med* 2016;44:1045-53
- **Besnier E**, Damm C, Jardel B et al. Dispatcher-assisted cardiopulmonary resuscitation protocol improves diagnosis and resuscitation recommendations for out-of-hospital cardiac arrest. *Emerg Med Australasia* 2015;27:590-6
- Clavier T, Tonon MC, Foutel A, **Besnier E** et al. Increased plasma levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, during systemic inflammation: a prospective observational study. *Crit Care*. 2014 ;18 :160-7
- Laidooowoo E, Baert O, **Besnier E**, Dureuil B. Dental trauma and anaesthesiology: epidemiology and insurance-related impact over 4 years in Rouen teaching hospital. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2012;31:23-8

• Revues générales:

- **Besnier E**. Ce que les réanimateurs doivent savoir du TAVI (en cours de relecture, 2020)
- **Besnier E**, Tamion F. Dysfonction endothéliale et sepsis. *Revue des anciens élèves de l'institut pasteur*. Septembre 2017.
- **Besnier E**, Grangé S, Tamion F. Les solutés balancés en réanimation. *Réanimation* 2016 ;25 :212-20
- **Besnier E**, Clavier T, Compère V, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anaesthetics- a review. *Anesth Analg* 2016
- **Besnier E**, Delille E, Coquerel D, Tamion F. Les voies du NO dans le sepsis. *Réanimation* 2015 ;24 :191-200
- **Besnier E**, Clavier T, Castel H *et al*. Interaction between hypnotic agents and the hypothalamic-pituitary-adrenocorticotrophic axis during surgery. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2014 ;33 :256-65

• Participation à des ouvrages collectifs

- *Traité de réanimation 4<sup>ème</sup> édition 2019. « Echec de l'extubation »*
- *Réanimation, Douleur, anesthésie et soins palliatifs, ECN branché, éditions ellipses 2017*
- *Physiologie humaine appliquée, chapitre « Physiopathologie des troubles nutritionnels dans les états d'agression : conséquences thérapeutiques », éditions Arnette 2017*
- *Mechanical ventilation in critically ill obese patients, chapitre «High Flow Nasal Cannula Therapy: Principles and potential use in obese patients», éditions Springer 2017*

AUTRES

- Etudes cliniques (investigateur principal):
  - Etude VEGFluid: corrélation entre le VEGF-A et la balance hydrique au cours du choc septique chez l'Homme.
  - PHRC InterRégional OFACS : Opioid Free Anesthesia For Cardiac Surgery
  - HiFlow-Heart: Impact of High Flow Nasal Cannula Therapy and Non Invasive Pressure Ventilation on Left Ventricular Diastolic Function- A physiologic proof concept
- Editeur associé de la revue "Médecine Intensive Réanimation"