HAL
open science

Les effets des substances vasoactives sur les perturbations hémodynamiques, systémiques et splanchniques induites par les états de choc et la cirrhose

Maher Tabka

▶ **To cite this version:**

Maher Tabka. Les effets des substances vasoactives sur les perturbations hémodynamiques, systémiques et splanchniques induites par les états de choc et la cirrhose. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0064 . tel-02174760

HAL Id: tel-02174760

https://theses.hal.science/tel-02174760

Submitted on 5 Jul 2019

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.

Thèse de Doctorat

Maher TABKA

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Pharmacologie*
Spécialité : *Pharmacologie expérimentale et clinique*
Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée (BNMI) INSERM UMR 1083 – CNRS UMR 6214*

Soutenue le *05/05/2015*
Thèse N° : *1456*

Les effets des substances vasoactives sur les perturbations hémodynamiques systémiques et splanchniques induites par les états de choc et la cirrhose.

JURY

Rapporteurs :	**Peter RADERMACHER**, PhD MD, Institut Für Anasthesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
	Jean Marc TADIE, PhD MD, CHU de Rennes Hôpital Pontchaillou Service de réanimation médicale et infectieuse
Examinateurs :	**Fabrice PRUNIER,** PhD MD, laboratoire de cardioprotection, remodelage et thrombose UPRES EA 3860
Invité(s) :	**Daniel HENRION**, PhD MD, Laboratoire de biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée CNRS UMR 6214 INSERM U1083.
	Nicolas LEROLLE, PhD MD, CHU Angers Service de réanimation médicale et médecine hyperbare
Directeur de Thèse :	**Pierre ASFAR**, PhD MD, CHU Angers Service de réanimation médicale et médecine hyperbare

REMERCIEMENTS

Avant tout, mes souhaits les plus chers seront de remercier vivement toutes les personnes, qui de près ou de loin, se sont impliquées dans la réalisation de ce travail, tant par leur soutien personnel, que professionnel.

Je tiens à remercier en tout premier lieu mon directrice de thèse, le professeur Pierre ASFAR de la confiance qu'il m'a faite en me recrutant pour le stage de Master 2 et pour avoir contribué de façon prépondérante à l'encadrement et à la réussite de ma thèse. A travers ses précieux conseils avisés, ses encouragements, ses recommandations et son dynamisme, il m'a transmis le plaisir de la recherche fondamentale et m'a permis de progresser et de mieux appréhender les différentes étapes parcourues. Qu'il soit assuré de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Je remercie sincèrement Nicolas LEROLLE pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Merci pour la pertinence de vos analyses scientifiques lors de nos discussions ou l'analyse des résultats.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu m'honorer de leur présence. Merci au Professeur Fabrice PRUNIER d'avoir honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Merci aux Professeurs Peter RADERMACHER et Jean Marc TADIE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci au Professeur Daniel HENRION qui m'a fait un grand hommage et plaisir d'examiner ce travail. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et le temps qu'ils ont consacré à l'examiner, qu'ils veuillent trouver ici le témoignage de mon profond respect et de toute ma considération.

Un grand merci à ma femme Emna JEMLI, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je la remercie pour ses précieux conseils. Qu'elle soit assurée de mon immense gratitude pour son soutien moral.

J'exprime mes sincères remerciements et ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe du laboratoire BNMI INSERM UMR 1083 – CNRS UMR 6214 avec laquelle j'ai effectué mes travaux

de thèse. Merci à toutes et à tous de votre chaleureux accueil lors de mon arrivée au laboratoire. J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe. Merci pour votre bonne humeur qui contribue à la bonne ambiance au sein de l'équipe.

Je remercie particulièrement la collègue la plus gentille du monde, Mathilde RENOU DE LA BOURDONNAYE pour son soutien, son aide lors des expérimentations et son temps consacré dans la correction des fautes d'orthographes de cette thèse. Je te souhaite une bonne continuation dans ta vie professionnelle et familiale avec David, Gaspard et le petit Albéric.
Je remercie Emilie VESSIERES pour sa disponibilité, ses réponses à toutes mes questions et sa formation en myographie.
Je remercie également l'ensemble des personnes ayant effectué leur stage dans le laboratoire pendant ces trois années : Rahmeh, Fanny, Pierre-Yves, Dorothée, Abdallah, Asma, maxime et Clément pour leur gentillesse et je leur souhaite une très bonne continuation dans leurs études médicales et dans la recherche scientifique.

Je remercie le personnel des services communs de l'animalerie pour leurs conseils et leurs enseignements enrichissants. Je tiens aussi à les remercier pour la sympathie qu'ils m'ont exprimé et leur dynamisme, ce qui a favorisé mon intégration au sein du laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble de l'équipe du laboratoire HIFIH UPRES EA 3859 et en particulier Lionel FIZANNE pour sa gentillesse et lui souhaite une très bonne continuation dans la recherche scientifique.

J'adresse également mes remerciements au laboratoire CRT UPRES EA 3860 et son équipe. Je tiens à remercier Sophie TAMAREILLE pour sa qualité d'écoute, son savoir et ses conseils apportés concernant la pratique de l'expérimentation animale.

Je tiens à remercier Oscar MCCOOK et toute l'équipe du laboratoire "Universitätsklinikum Ulm Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV)" pour les informations, la mise en pratique de la technique d'Histoimmunochémie, leurs conseils, soutien et aide.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mes amis de la ville d'Angers et plus particulièrement Anaïs, Martine et Marjorie pour leur soutien morale et leur fidélité.

Enfin, ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif et financière de ce travail doctoral : ma famille ainsi que la famille JEMLI. A mes

chers parents (Mehrez et Rafika), mes frères et sœurs, mes beaux parents (Habib et Asma), mes belles sœurs et mes beaux frères, je vous souhaite plein de bonheur dans vos vies professionnelles et personnelles. Un merci tout spécial à ma belle mère Asma BOUZOUITA pour ses multiples encouragements à persévérer dans l'effort.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles

1. Burban M, Hamel JF, **Tabka M**, Renou de La Bourdonnaye M, Duveau A, Mercat A, Calès P, Asfar P and Lerolle N. Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats.
   Critical Care 2013.

2. **Tabka M** et al. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamic and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats.
   Soumis

3. **Tabka M** et al. Systemic and splanchnic hemodynamic effects and splanchnic vascular reactivity of Terlipressin vs Noradrenaline in cirrhotic rats.
   En cours de Soumission

Communications orales

Paris, Janvier 2014. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF). Etude des effets du sulfure d'hydrogène sur l'hémodynamique et la fonction rénale au cours du choc hémorragique réanimé chez les rats.

Paris, Janvier 2014. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF). Evaluation des effets hémodynamiques de la terlipressine et de la noradrénaline sur l'hémodynamique splanchnique dans la cirrhose chez le rat.

Angers, Janvier 2014. La journée scientifique du Laboratoire BNMI (BNMIades). Hemodynamic effects of terlipressin and norepinephrine on systemic and splanchnic circulations in cirrhotic rats.

Angers, Janvier 2014. La journée scientifique du Laboratoire BNMI (BNMIades). Effects of hydrogen sulfide on hemodynamic and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats.

Angers, Juin 2013. La journée scientifique du Laboratoire BNMI (BNMIades). Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats.

Communications affichées

Nantes, Décembre 2013. Les journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé Nantes/Angers. Evaluation des effets hémodynamiques de deux vasoconstricteurs sur la circulation veineuse collatérale chez le rat cirrhotique.

Nantes, Novembre 2012. Les journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé Nantes/Angers. Etude de l'hémodynamique et de l'autorégulation rénale dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat. Influence du sepsis.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS 11
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES 17
INTRODUCTION 19
I. CAS PARTICULIERS : CHOC SEPTIQUE 29
1. Définition et Epidémiologie 29
2. Relation hôte - pathogène 30
3. Activation cellulaire 32
4. Action des médiateurs de l'inflammation 36
4.1. Médiateurs pro-inflammatoires 36
4.2. Médiateurs anti-inflammatoires 38
4.3. L'interleukine 6 (IL-6) 39
5. Activation de l'inflammation et de la coagulation 40
5.1. Endothélium et inflammation 40
5.2. Endothélium et coagulation 41
6. Conséquences cliniques importantes 44
6.1. Insuffisance circulatoire 44
6.2. Défaillance d'organe 44
II. CAS PARTICULIERS : CHOC HEMORRAGIQUE 46
1. Définition et Epidémiologie 46
2. Mécanismes mis en jeu au cours du choc hémorragique 47
2.1.1 La phase sympatho-excitatrice 48
2.1.2 La phase sympatho-inhibitrice 50
3. La réponse inflammatoire et immunologique 50
4. Défaillance microcirculatoire 52
4.1. La dysfonction endothéliale 53
4.2. La dysfonction vasculaire 53
4.3. La dysfonction hémostatique 54
III. CAS PARTICULIERS : LA CIRRHOSE 55
1. Définition et Epidémiologie 55
2. Etiologie et facteurs de risque 56
3. Modifications histologiques : Fibrose hépatique 56
3.1. Amplification de la matrice extracellulaire 56
3.2. Activation des cellules étoilées 59
3.3. Complications de la fibrose hépatique 62

4. Modifications splanchniques : Hypertension Portale 62
4.1. L'augmentation des résistances intra hépatiques 62
4.2. L'augmentation du débit sanguin portal 64
5. Modifications systémiques : hypercinésie circulatoire 65
OBJECTIFS DE LA THESE 69
ETUDE 1 : 71
Etude de l'hémodynamique et de l'autorégulation rénale dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat. Influence du sepsis. 71
1. FONCTION RENALE ET CHOC SEPTIQUE 72
1.1. Anatomie générale du rein 72
1.2. Principe de l'autorégulation rénale 75
1.3. Conséquences rénales avec un épisode d'ischémie/reperfusion 78
2. NORADRENALINE ET CHOC SEPTIQUE 79
2.1. Généralités 79
2.2. Pharmacodynamie 80
2.3. Pharmacocinétique 81
2.4. Utilisation au cours du choc septique 81
3. METHODE D'ANALYSE DE LA MICROCIRCULATION RENALE 81
3.1. Principe de l'imagerie SDF 82
3.2. Description des conditions de recueil des paramètres 85
4. OBJECTIFS DE L'ETUDE 89
5. ARTICLE : *"Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats"* 91
6. CONCLUSION 101
ETUDE 2 : 102
Etude des effets du sulfure d'hydrogène sur l'hémodynamique et la fonction rénale au cours du choc hémorragique réanimé chez les rats. 102
1. L'HYDROGENE SULFURE 103
1.1. Définition et Historique 103
1.2. Synthèse, régulation et Catabolisme 103
1.3. Effets physiologiques de H_2S 106
1.3.1. Rôle de H_2S dans l'hypométabolisme induit 107
1.3.2. Rôle de H_2S dans l'inflammation 109
1.3.3. Rôle de H_2S dans l'apoptose 112
1.3.4. Rôle de H_2S dans l'endothélium (la motricité) 113
1.3.5. Rôle de H_2S dans l'ischémie rénale 114
2. OBJECTIFS DE L'ETUDE 116
3. ARTICLE : *"Effects of hydrogen sulfide on hemodynamic and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats"* 118

4. CONCLUSION 147
ETUDE 3 : 148
Evaluation des effets hémodynamiques de la terlipressine et de la noradrénaline sur l'hémodynamique splanchnique dans la cirrhose chez le rat. 148
1. LE SYSTEME PORTE 149
1.1. Physiologie de la circulation splanchnique 152
1.2. En situation pathologique 152
2. LA TERLIPRESSINE 153
2.1. Historique 153
2.2. Pharmacologie 153
2.3. Effets hémodynamiques de la terlipressine 155
2.4. Au cours des hémorragies digestives 156
2.5. Au cours du syndrome hépato-rénal 157
3. LA NORADRENALINE 158
4. OBJECTIFS DE L'ETUDE 160
5. ARTICLE : "*Systemic and splanchnic hemodynamic effects and splanchnic vascular reactivity of Terlipressin vs Noradrenaline in cirrhotic rats"* 161
6. CONCLUSIONS 196
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 197
BIBLIOGRAPHIE 199

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAT : aspartate aminotransférase

AC : adénylate cyclase

ACCP : American college of Chest Physicians

ACE *: Angiotensin-converting enzym*

ACh : acétylcholine

ACTH : hormone adrénocorticotrope

ADH : hormone anti-diurétique

ADM : adrénomédulline

ADMA : diméthylargine

ADP : adénosine diphosphate

Akt : protéine kinase B

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

Ang-1 : angiopoietine-1

ANP : peptide natriurétique atrial

AP1: activator protein 1

AT II : angiotensine II

ATP : adénosine triphosphate

ATS : American Thoracic Society

AVA® : *Automated Vascular Analysis*, MicroVision Medical

AVP : arginine-vasopressine

Ca^{2+} : calcium

CARD : *caspase-activating and recruitement domain*

CARD : caspase-recruitment domain

CARS : *compensatory anti-inflammatory response syndrome*

CBDL : *common bile duct ligation*,

CBF : débit carotidien (« *carotid blood flow* »)

CBS : cystathionine ß-synthase

CCl_4 : *carbon tetrachloride induced cirrhosis*

CDO : cystéine désoxygénasse

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

CK : cytokine

CMVL : cellules musculaires lisses vasculaires

CO: Carbon monoxide

COX-2 : cyclooxygenase-2

CREB : cAMP-responsive element-binding protein

CRF : *Cortico releasing factor*

CSD : cystéine sulphinate décarboxylase

CSE : cystathionine ɣ-lyase

Cys : cystéine

DAG : diacylglycerol ;

DAP *: meso-diaminopimelic acid*

DFG : débit de filtration glomérulaire

dsDNA : double-stranded DNA

DSR : débit sanguin rénal

dsRNA : double-stranded RNA

ECs: Endogenous cannabinoids

EDHF: Endothelium derived hyperpolarizing factor

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

EPCR : récepteur endothélial de la protéine C

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ESICM : European Society of Intensive Care Medecine

FADD : FAS-associated death domain

FT : facteur tissulaire

G_q : protéine G/sous-unité alpha de type q

G_s : protéine G/sous-unité alpha de type s

GAGs : glycosaminoglycanes

GC : guanylate cyclase

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GNMT : glycine *N*-methyltransferase

GRK2 : *G-protein-coupled receptor kinase-2*

GSH : glutathion réduit

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

H_2S : sulfure d'hydrogène ou hydrogène sulfuré

HA : hydroxylamine

HDH : hypotaurine déshydrogénase

HMGB1 : *High mobility group protein I*

HR : fréquence cardiaque (« *heart rate* »)

HSC : hepatic stellate cells

HSCs : cellules étoilées du foie

Hsp *: Heat-shock proteins*

HTP : hypertension portale

I/R : ischémie-reperfusion

ICAM : *intercellular adhesion molecule*

iE-DAP : γ-D- glutamyl -meso- diaminopimelic acid

IFN : interférons de type I

IHC : immunohistochimie

IKK : inhibitor of NF-κB kinase

IL : interleukine

INF-γ : l'interféron-γ

iNOS : *inductible nitric oxidase synthase*

IP3 : inositol triphosphate

IRA : insuffisance rénale aiguë

IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF : IFN-regulatory factor

ISRE : IFN-stimulated response element

IκBα : inhibitor of NF-κBα

JNK : JUN N-terminal kinase

KDO : 3-deoxy-D-manno-octulosonate

LBP *: Lipoprotein binding proteins*

LPS : lipopolisaccharide

LRR : domaine leucine-rich repeat

LSEC : liver sinusoidal endothelial cell

LVP : lysine-vasopressine

MAL : MYD88 adaptor-like protein

MAP : pression artérielle moyenne

MAP3K : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MAPK-ERK : *mitogen activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinases*

MasR *: G-protein coupled recepter Mas*

MD2 : myeloid differentiation factor 2

MDP : muramyl dipeptide

MEC : matrice extracellulaire

MEK : mitogen-activated protein kinase/ERK kinase

MIF : *Macrophage migration inhibitory factor*

MKK : mitogen-activated protein kinase kinase

MLC : *Myosine Light Chain*

MLCK : *Myosine Light Chain Kinase*

MMP : métalloprotéinases matricielles

MPST ou MST : 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase

mPTP : *mitochondrial permeability transition pore*

MyD88 : *Myeloid differentiation protein 88*

NAFLD *: non-alcoholic fatty liver disease*

NaHS : hydrosulfure de sodium

NE : noradrénaline

NEMO : NF-κB essential modulator

NF-κB *: nuclear factor kappa B*

NO : monoxyde d'azote

NOD : nucleotide-binding oligomerisation domain 1 et 2

NOS : monoxyde d'azote synthase

NTS : noyau du tractus solitaire

O_2 : oxygène

OMPA : outer membrane protein A

OPS : *Orthogonal Polarization Spectral*

OT : Les récepteurs d'ocytocine

p38MAPK

PA : pression artérielle

$PaCO_2$: pression artérielle en dioxyde de carbone

PAG : DL-propargylglycine

PAM : pression artérielle moyenne (ou MAP « *mean arterial pressure* »)

PAMPs *: pathogen-associated molecular patterns*

PaO_2 : pression artérielle en oxygène

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PG : prostaglandines

PGI_2 : prostacycline

PGN : peptidoglycan.

PGs : protéoglycanes

Pi : phosphate inorganique

PI3K : phospho-inositol 3 kinase

PIGF *: placenta growth factor*

PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ;

PKA : protéines kinases A

PKC : protéine kinase C

PKCε : protein kinase Cε

PKG : protéine kinaseG

PLB : phospholamban

PRR *: Pattern recognition receptors*

PVL : *portal vein ligation*

PVP : pression de la veine porte

R : récepteur couplé à une protéineG

RAA : systèmes Rénine-Angiotensine-Aldostérone

RBF : débit artériel rénal (« *renal blood flow* »)

RICK : receptor-interacting serine/threonine kinase

RIP1 : receptor-interacting protein 1

R-IP3 : récepteur à l'IP3

RISK : *reperfusion injury salvage kinase*

ROC : canaux récepteur-dépendants (*Receptor Operated Channels*) ;

ROS : Radicaux Libres Oxygénés

RTG : rétrocontrôle tubuloglomérulaire

RVS : résistances vasculaires systémique

Ry-R : récepteur à la ryanodin

SCCM : Society of Critical Care Medecine

SDF : *sublingual sidestream dark field*

SDMV : syndrome de défaillance multiviscérale

Serca : *Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*

sGC : soluble guanylate cyclase

SHR : syndrome hépatorénal

SIRS : *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

SIS : Surgical Infection Society

SMABF : débit de l'artère mésentérique supérieur (*superior mesenteric arterial blood flow*)

SNS : Système Nerveux Sympathique

SO : sulphite oxydase

SRA : système rénine angiotensine

ssRNA : single-stranded RNA

sTNFR : les récepteurs solubles du TNF-α

TAB : TAK1-binding protein

TAK1 : TGFβ-activated kinase 1 (MAP3K7)

TBK1 : TANK-binding kinase 1

TGF-b : *transforming-growth factor b*

TGF-β : *transforming growth factor β*

TIMP *: tissue inhibitor of metalloproteinases*

TLR : *toll-like receptor*

TNFα : tumor necrosis factor α

TP : terlipressine

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

TRAF : tumour necrosis factor receptor-associated factor

TRAM : TRIF-related adaptor molecule

TRIF : TIR-domain_containing adapter-inducing interferon-β

TSR : thiosulfate reductase

TSST : thiosulfate sulphurtransferase

TTU : transit time ultrasound

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VES : volume d'éjection systolique

VIP : peptide inhibiteur vasoconstriction (*Vasoactive Inhibitor Peptide*)

VO_2 : consommation d'oxygène

VOC : canaux voltage-dépendants (*Voltage Operated Channels*)

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Listes des tableaux :

Tableau 1: Définitions des états inflammatoires et infectieux, adaptées d'après ACCP/SCCM 30
Tableau 2: Modifications hémodynamiques hépatiques, splanchniques et systémiques chez le patient cirrhotique 68
Tableau 3: Effets des catécholamines en fonction du tissu concerné 159

Listes des figures :

Figure 1: Mécanismes de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV) 24
Figure 2: Le mécanisme d'angiogenèse par Sproting et Spilling dans la cirrhose. 27
Figure 3: Présentation structurale de deux principales classes de bactérie 31
Figure 4: Voie de signalisation des protéines TLRs 34
Figure 5: Voie de signalisation de NOD1 et NOD2. 35
Figure 6: Mécanisme d'interaction des cellules endothéliales avec l'inflammation au cours du sepsis 41
Figure 7: La cascade de coagulation dans le sepsis 42
Figure 8: Relation entre inflammation et coagulation 43
Figure 9: Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par le sepsis 45
Figure 10: Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans le choc hémorragique 48
Figure 11: Les cellules de la sinusoïde hépatique. 58
Figure 12: Activation des cellules étoilées en réponse d'une agression hépatique. 61
Figure 13: Vasoconstriction intrahépatique par diminution de NO 64
Figure 14: Rôle de la circulation porto-systémique dans la vasodilatation splanchnique 65
Figure 15: Schéma de la relation entre la vasodilatation splanchnique, le syndrome d'hypercinésie circulatoire, et l'hypertension portale dans la cirrhose hépatique. 67
Figure 16: Anatomie du rein, disposition des néphrons et organisation de la vascularisation rénale 73
Figure 17: Organisation du glomérule 74
Figure 18: Mécanisme du rétrocontrôle tubuloglomérulaire 77
Figure 19: Schéma présentant les composants de l'imagerie SDF 82
Figure 20: Schéma présentant le principe de l'imagerie SDF 83
Figure 21: Exemple d'acquisition de microcirculation en imagerie SDF 83
Figure 22: MicroScan® SDF, appareil d'acquisition 84
Figure 23: Analyse des séquences vidéo obtenues avec le logiciel AVA® 3.0 : cartographie des vaisseaux 86
Figure 24: Diagramme espace-temps avec le logiciel AVA® 3.0. 87
Figure 25: Analyse des séquences vidéo obtenues avec le logiciel AVA® 3.0 : diagramme espace-temps 88
Figure 26: Mécanisme microcirculatoire de l'affection du transport d'oxygène : le shunt fonctionnel 101
Figure 27: Production endogène et métabolisme de H_2S 105

Figure 28: Effets de H2S dans l'inflammation, le stress oxydant, l'apoptose et les fonctions cardiovasculaires 107
Figure 29: Représentation schématique des mécanismes potentiels des effets protecteurs de H_2S 111
Figure 30: Schéma des voies de transduction des signaux qui sous-entend les changements induits par H_2S sur la croissance cellulaire 113
Figure 31: Anatomie du système porte veineux 149
Figure 32: Les sites des anastomoses porto-systémique dans la cirrhose 151
Figure 33: La structure chimique de la terlipressine 155

INTRODUCTION

Au cours du développement humain, l'appareil circulatoire est l'un des premiers à s'ébaucher. Durant le développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins prennent naissance par vasculogénèse. Suite à la formation du premier réseau vasculaire, les cellules endothéliales continuent à proliférer et à former des nouveaux capillaires. La structure de la paroi des vaisseaux s'adapte au débit et à la pression du flux sanguin. Ce fait traduit l'importance vitale du flux circulatoire dès le début de l'embryogenèse. Il alimente en effet les tissus en formation et draine les résidus de la nutrition selon leurs besoins. Après la naissance, d'importantes transformations vont avoir lieu, et le système cardiovasculaire s'adapte afin de permettre l'indépendance de l'organisme et une perfusion complète de tous les organes.

Une des fonctions essentielles du système cardiovasculaire est d'assurer un apport en oxygène et en nutriments en adéquation avec la demande métabolique cellulaire. Plusieurs mécanismes vasculaires contribuent à adapter les apports en oxygène aux besoins cellulaires et selon les situations physiologiques et physiopathologiques. Une bonne perfusion tissulaire se traduit sur le plan hémodynamique par une pression artérielle systémique stable et un débit cardiaque constant. La dysfonction des mécanismes de régulation vasculaire est au centre des hypoxies tissulaires qui contribuent aux dysfonctions d'organes observées dans les états de choc.

Le système cardiovasculaire est composé d'un réseau fermé et très ramifié des vaisseaux transportant le sang, sous l'impulsion du cœur. Le système vasculaire permet de distribuer le sang dans tous les tissus apportant ainsi aux cellules de l'organisme l'oxygène et toutes les autres molécules dont elles ont besoin. En même temps, il permet d'éliminer le dioxyde de carbone et les déchets issus du métabolisme, en les transportant au niveau des reins ou des poumons. On peut distinguer dans le système vasculaire le réseau artériel qui part du cœur vers les organes et le réseau veineux qui ramène le sang au cœur. Par leur élasticité et leur contractilité, les vaisseaux régulent le débit sanguin dans les organes et l'adaptent aux besoins nutritifs locaux. Cette capacité d'adaptation est le résultat d'un contrôle nerveux, humoral et hémodynamique. Les vaisseaux sanguins possèdent tous une architecture de base commune. De la lumière du vaisseau vers l'extérieur, une artère s'organise en trois tuniques concentriques. Chacune de ces tuniques est constituée d'un type cellulaire différent et d'une matrice extracellulaire (MEC) spécifique.

- L'intima, la partie la plus interne de la paroi, est formée de l'intérieur vers l'extérieur, d'une mono-couche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif

appelée lame basale. Ces cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant et donc avec les métabolites, les hormones, les facteurs neurohumoraux, et tout ce que peut transporter le sang. Ces cellules secrètent de nombreuses substances vasodilatatrices (monoxyde d'azote (NO), prostacycline, bradykinine), vasoconstrictrices (endothéline, angiotensine, thromboxane A2), antiagrégantes (prostacycline) et fibrinolytiques (activateur du plasminogène) ainsi que des facteurs de croissance (Alexander *et al*., 1998). Grâce à ces propriétés et à son revêtement impropre à l'adhésion plaquettaire et à la coagulation, l'endothélium constitue une barrière protectrice contre la thrombose et est au centre de la régulation du tonus vasomoteur artériel.

- La média, partie intermédiaire de la paroi, est composée de cellules musculaires lisses organisées de façon concentrique et de constituants extracellulaires (fibres élastiques, fibres d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène). Selon le territoire vasculaire et la fonction de ces vaisseaux, la média des grosses artères est surtout formée d'éléments élastiques (artères élastiques) tandis que la média des artères de moyen et de petit calibre est surtout riche en fibre musculaire (artères musculaires). Ces cellules musculaires lisses sont responsables du tonus vasculaire. Elles sont également capables de remodeler en permanence les vaisseaux en proliférant et en produisant de la matrice extracellulaire.

- L'adventice, la partie la plus externe de la paroi, est constituée de collagène fibrillaire, d'amas de cellules musculaires lisses et de micro-vaisseaux appelés vasa vasorum qui apportent les nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau.

En fonction des différences structurales et fonctionnelles, les artères se divisent en deux groupes :

- Les artères de conductance ou élastiques, de gros calibres, sont riches en fibres d'élastine et en collagène. L'élastine confère une très grande élasticité. Le collagène a pour rôle de s'opposer à une trop forte variation du rayon et va permettre ainsi de réduire l'extensibilité de la paroi.

- Les artères de résistance ou musculaires contiennent en majorité des fibres musculaires lisses jouant un rôle prépondérant dans la régulation systémique de la pression artérielle pour une distribution optimale du sang dans chaque tissu.

Sur le plan anatomique il n'existe pas une véritable séparation entre la macro et la microcirculation. Cette dernière est liée directement à la perfusion tissulaire, ainsi, l'architecture de ses vaisseaux est spécifique de chaque organe et est étroitement déterminée par la fonction de l'organe et ses besoins énergétiques. Elle se compose d'artérioles, de capillaires et de veinules.

Les artères se divisent pour former le réseau artériolaire. Les artérioles sont des vaisseaux de diamètre plus petit que les artères, mais avec une composition relativement semblable à celles des artères musculaires. Les artérioles restent en permanence en semi-contraction et leur résistance est nécessaire à la production de la pression sanguine. Les plus petites artérioles déversent leur contenu dans le réseau capillaire. Les capillaires sont de très fins vaisseaux, constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales avec une lame basale et quelques fibres de collagène. C'est au niveau des capillaires que vont se faire tous les échanges entre le sang et les tissus vascularisés. Les capillaires sont aussi le lien entre le système artériel et veineux. Les veinules et les veines, contrairement aux autres vaisseaux, possèdent des valves anti-reflux qui permettent au sang de ne circuler que dans un seul sens : des organes vers le cœur. Les veines sont plus extensibles que les artères et la vitesse d'écoulement du sang y est très faible et la pression basse.

Les artérioles sont responsables du tonus vasculaire et régulent la distribution du débit sanguin dans les lits capillaires. Le tonus vasculaire des artérioles est contrôlé par le système autonome, les substances vasoactives présentes dans le sang (catécholamines, angiotensine II, vasopressine) et par un contrôle tissulaire local. La modulation locale du tonus vasculaire est l'élément essentiel de l'adaptation de la perfusion vasculaire aux besoins locaux en oxygène. Deux mécanismes interviennent dans la genèse de ce contrôle local : la réponse myogénique et la réponse métabolique.

La réponse métabolique permet d'adapter au mieux le tonus vasculaire aux besoins cellulaires en oxygène. Lors d'une hypoxie le défaut d'oxygène limite la production d'ATP ainsi l'ADP s'accumule avec ses produits de dégradation (AMP, adénosine). De plus la glycolyse est activée avec une production de lactate et d'ion H^+. L'adénosine, le lactate et l'ion H^+ sont des vasodilatateurs artériolaires et ils contribuent à tenter de maintenir un apport tissulaire en

oxygène en condition d'hypoxie. Une augmentation de production de CO_2, en cas d'élévation du métabolisme cellulaire ou en cas d'absence d'épuration lors d'une hypoperfusion tissulaire, qui est également un puissant vasodilatateur. Enfin, la variation de PO_2 lors d'une réponse métabolique pourrait stimuler le cytochrome oxydase mitochondrial et ainsi influencer le tonus artériolaire par le biais de médiateurs (espèces radicalaires de l'oxygène).

La réponse myogénique (cf. Figure 1) est la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) en réponse à une augmentation de pression intravasculaire. Elle tend à maintenir la tension de la paroi vasculaire à sa valeur basale. Des facteurs métaboliques et neurovégétatifs locaux y jouent un rôle important. L'importance de chaque mécanisme est déterminée par les besoins en oxygènes du tissu, dans le but de garantir une perfusion systémique et locale suffisante. Par vasoconstriction ou vasodilatation des vaisseaux de résistance, des artérioles, une interaction constante se fait entre ouverture et fermeture des anses capillaires et donc une perfusion tissulaire plus ou moins importante en fonction des besoins. Dans les troubles circulatoires fonctionnels, il se produit une constriction ou une dilatation inadéquate des vaisseaux sans qu'une lésion vasculaire organique ne soit décelable. Des facteurs endogènes, neurogènes, hormonaux ou métaboliques peuvent déclencher une contraction des cellules musculaires lisses des vaisseaux.

La vasoconstriction résulte de l'augmentation de la réserve réticuloplasmique de calcium dans les CMLV. Cette augmentation du calcium intracellulaire est une conséquence de deux systèmes dépendants et synergiques :
Des molécules neuronalex ou hormonalex, telles que l'angiotensine II, la noradrénaline ou la vasopressine peuvent déclencher une cascade enzymatique via leurs récepteurs membranaires spécifiques sur la CMLV (récepteurs couplés à une protéine G). Ainsi, la phosphatidylinositol bisphosphate de la couche lipidique membranaire s'hydrolyse en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol sous l'action enzymatique de la phospholipase C. L'IP3 induit l'ouverture des canaux calciques réticuloplasmiques et la libération du calcium selon le gradient de concentration vers le cytoplasme. D'autre part, l'augmentation du calcium intracytoplasmique peut également être due à une dépolarisation des CMLV induisant l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants et l'entrée du calcium extracellulaire dans la CMLV. Ainsi, le calcium intracytoplasmique va se complexer à différentes molécules dont la calmoduline. Le complexe Ca^{2+}-Calmoduline ainsi formé, active la protéine *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), responsable de la phosphorylation et ainsi de l'activation des chaînes légères de

myosine (*Myosin Light Chain*). Ces derniers permettent la contraction des filaments d'actine, par leur activité ATPasique, et ainsi la contraction du muscle lisse vasculaire.

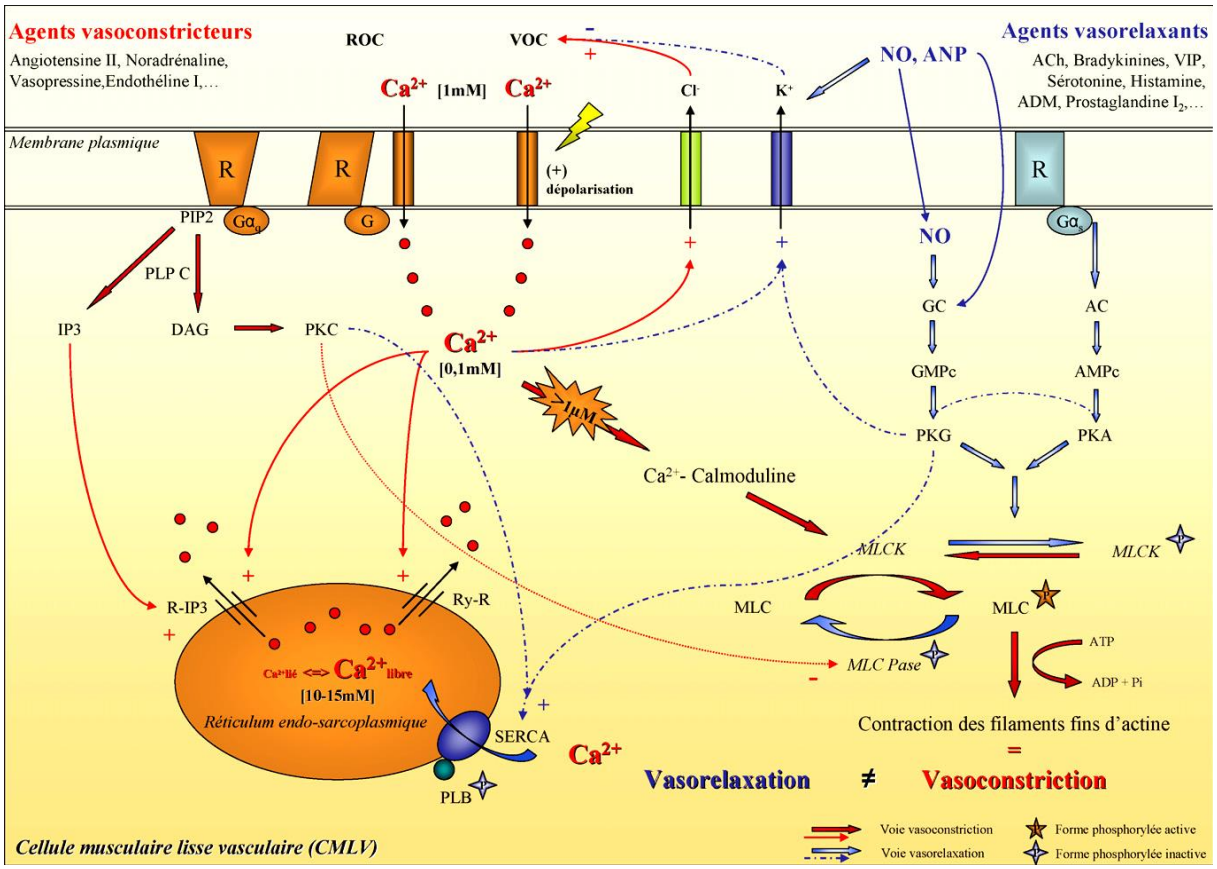


Figure 1: Mécanismes de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV)
(*Collin et al., 2008*)

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

La vasodilatation résulte de la diminution de la concentration du calcium intracytoplasmique soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum endoplasmique. Parmi les mécanismes mis en jeu, certains médiateurs vasorelaxants, comme le NO, le peptide natriurétique atrial ou l'acétylcholine, la

sérotonine et l'histamine, entraînent respectivement, par l'action de la guanylate cyclase et de l'adénylate cyclase, l'augmentation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Des protéines kinases sont alors activées (PKG et PKA) et sont responsables de la phosphorylation du phospholamban. Ce peptide à l'état non phosphorylé est un inhibiteur des pompes ATPases-Ca^{2+} dépendantes du réticulum sarcoplasmique responsables du recaptage du calcium du cytoplasme vers le réticulum. Ainsi, la phosphorylation du phospholamban induit la diminution de la concentration cytoplasmique du calcium, et donc une relaxation de la CMLV et une vasodilatation. Par ailleurs, les protéines kinases PKG et PKA sont également responsables de la phosphorylation de la MLCK, la rendant inactive, ce qui contribue à la relaxation de la CMLV et à la vasodilatation. Enfin, la diminution du calcium intracytoplasmique peut également être due à l'efflux du calcium par stimulation des ATPases-Ca^{2+} dépendantes de la membrane plasmatique, de l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} ou par l'activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants. En effet, après phosphorylation de ces derniers par la PKG ou activation directe par le NO, il se produit une hyperpolarisation membranaire qui inhibe l'entrée du calcium via les canaux calciques voltage-dépendants conduisant à une vasodilatation.

La défaillance vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus vasoconstricteur et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux catécholamines. Il en résulte une vasodilatation inappropriée et une hypotension artérielle réfractaire pouvant conduire au décès du patient. Cette défaillance vasculaire est principalement observée au cours des états de choc cardiogénique, hypovolémique, vasoplégique et septique. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la physiopathologie de la défaillance vasculaire au cours des états de choc. Le NO, produit en excès par la NO synthase inductible (NOSi), constitue l'un des principaux acteurs impliqué dans la vasoplégie et l'hyporéactivité vasculaire aux vasopresseurs. Les désordres hémodynamiques de ces états de choc entraînent une chute de la volémie et du débit cardiaque conduisant à une diminution du transport en oxygène et à des lésions tissulaires.

Au niveau des capillaires, la disposition axiale des globules rouges diminue la viscosité sanguine et réduit le coût énergétique du passage du sang au travers de la microcirculation permettant ainsi une distribution hétérogène de la perfusion. La moindre réduction de calibre du capillaire augmente la viscosité locale de façon très importante et ainsi ralentit la perfusion microvasculaire. L'hétérogénéité vasculaire pourra diminuer pour s'adapter à une hypoxie locale ou pourra s'accentuer lors d'altérations de la microcirculation comme celles constatées

dans les états de choc septique. Ainsi, au cours des états de choc, l'augmentation de la viscosité sanguine favorise la fuite plasmatique capillaire, qui avec la construction d'œdèmes, peut provoquer une augmentation des hydrauliques capillaires avec ralentissement voire arrêt des globules rouges dans certains capillaires. Il en résulte alors des capillaires hypoperfusés générateurs d'hypoxie tissulaire avec une redistribution du débit sanguin vers des capillaires restés ouverts, voire vers d'autres microcirculations (Buwalda *et al., 2002*)

Dans l'organisme sain, le système vasculaire est stable et il est finement contrôlé en dehors des situations pathologiques, telles que la rétinopathie, l'ischémie ou le développement tumoral, où une angiogenèse non régulée se met en place. L'angiogenèse est un phénomène par lequel les organismes multicellulaires vont recruter de nouveaux vaisseaux sanguins pour leur permettre un apport en nutriments et surtout en oxygène et assurer leur croissance et/ou leur survie. Ce processus est régulé par une balance entre des molécules favorisant l'angiogenèse appelées pro-angiogéniques (VEGF (*Vascular endothelial growth factor)*, PDGF, FGF,…) et des molécules la limitant appelées anti-angiogéniques.

Dans les conditions normales, les cellules endothéliales au repos croissent en monocouche et leur prolifération est maintenue à un taux très faible puisqu'elles sont attachées à la lame basale *via* les protéines de la matrice extracellulaire et entre elles par les molécules intercellulaires.
Le processus d'angiogenèse est essentiel pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au développement embryonnaire, à la réparation tissulaire et aux fonctions reproductrices comme la régénération de l'utérus et la formation du corps jaune et du placenta.

Les nouveaux vaisseaux prennent place à la suite de deux mécanismes, le "sprouting" et l'intussusception ou "spilling" (cf. Figure 2). Lors du "sprouting" (bourgeonnement), il y a activation des cellules endothéliales et libération des molécules pro-angiogéniques, ce qui entraîne une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Cette dégradation permet la séparation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses du vaisseau préexistant et leur migration vers les zones de stimulation angiogénique. Puis les cellules endothéliales se prolifèrent et se lient entre elles et entre les cellules des vaisseaux voisins permettant la différenciation en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire. Au cours de l'intussusception, les deux parois opposées d'un capillaire s'étendent l'une vers l'autre et forment un pilier intraluminal. Les cellules endothéliales

forment des jonctions entres elles et poussent à l'intérieur des vaisseaux, créant des canaux vasculaires séparés.

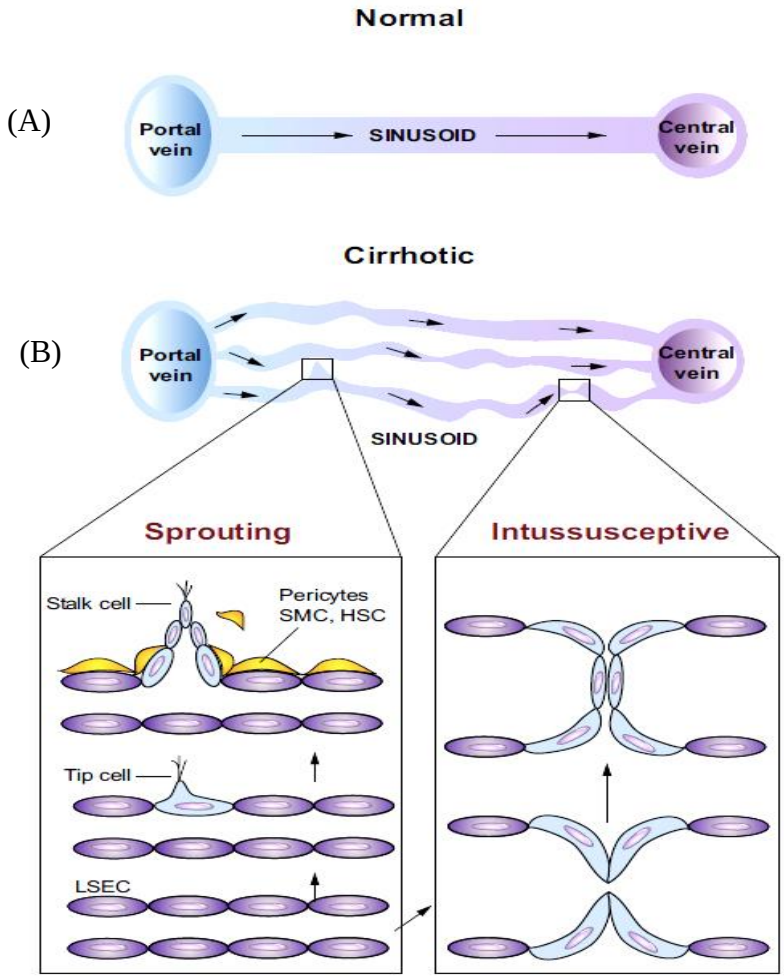


Figure 2: Le mécanisme d'angiogenèse par Sproting et Spilling dans la cirrhose.
(*Iwakiri et al., 2014*)

(A) Architecture normale de la vascularisation sinusoïdale avec écoulement normal à partir des veinules portes, à travers la microcirculation sinusoïdale, jusqu'au veines centrales.
(B) Les vasculatures sinusoïdales dans les foies cirrhotiques sont modifiés de façon significative, avec une augmentation du nombre de vaisseaux sinusoïdaux (angiogenèse) de différents diamètres et modèle d'écoulement. Ceci est un schéma simplifié de la microcirculation sinusoïdale dans la cirrhose du foie. Dans le mécanisme d'angiogenèse par Sprouting, l'activation de l'endothélium provoque la prolifération des cellules (Tip cell) en créant des liaisons entres les cellules des vaisseaux voisins et ainsi la formation d'un réseau vasculaire. L'angiogenèse par Intussusceptive induit la formation d'un pilier intraluminal. Les deux formes de l'angiogenèse nécessitent le recrutement de péricytes et les cellules musculaires lisses. Dans les foies cirrhotiques, l'activation des cellules étoilées du foie (HSCs) stimule le phénomène d'angiogenèse.

Dans des situations physiopathologiques, la formation des nouveaux vaisseaux par angiogenèse pourrait se mettre en place à partir des vaisseaux préexistants, afin de résister à des modifications hémodynamiques et réduit l'hypoxie tissulaire, dont le résultat final est la

morphogenèse d'un arbre vasculaire complexe et multifonctionnel. Ce processus adaptatif face aux situations pathologiques telles que la cirrhose favorise la formation des vaisseaux collatéraux. La vasodilatation artérielle splanchnique au cours de la cirrhose, responsable d'une augmentation du débit sanguin dans la veine porte, conduit à la formation d'un réseau veineux collatéral porto-systémique après stimulation de l'angiogenèse (*Van Stennkiste et al., 2010*). Ce shunt porto-systémique est mis en place pour décompresser le système portal, lui-même responsable de complications cardiovasculaires importantes telles que l'hémorragie des varices œsophagiennes.

Dans la présente étude, nous avons évalué l'adaptation du système circulatoire dans les territoires systémique, splanchnique et rénal dans des situations pathologiques, et les effets de certaines molécules sur l'hémodynamique et la fonction de l'organe (foie et reins). Etant donné les nombreux mécanismes physiopathologiques communs aux états de choc, nous avons choisi de travailler sur deux modèles expérimentaux de choc hémorragique et de choc septique. Dans le modèle choc hémorragique suite à un sepsis, nous avons étudié les effets thérapeutiques de la noradrénaline sur les réponses microvasculaires capillaires glomérulaires et péritubulaires face aux variations de pression dans l'artère rénale. Dans le modèle de choc hémorragique retransfusé et contrôlé par un remplissage vasculaire, nous avons évalué les voies endogènes et exogènes d'un gaz toxique administré au moment de la reperfusion (H_2S).

Concernant la problématique de la cirrhose, nous avons mis au point un modèle expérimentale d'hypertension portale, dans le but de comparer les effets de deux vasoconstricteurs (Noradrénaline et Terlipressine) sur la dysfonction vasculaire. Ce travail s'inscrit dans la suite des études réalisées dans le laboratoire et vise plus particulièrement à préciser les mécanismes mis en jeu tant sur le plan hémodynamique que sur le plan fonctionnel.

Ainsi, après une présentation physiopathologique de l'état de trois cas particuliers de la défaillance vasculaire (choc septique, choc hémorragique et cirrhose hépatique), nous exposerons l'état actuel des connaissances sur l'hydrogène sulfuré, la Noradrénaline et la Terlipressine, puis nous aborderons la physiopathologie rénale et les méthodes d'analyse de la microcirculation rénale, et la physiopathologie splanchnique, enfin, nous présenterons les travaux de recherche expérimentale réalisés au cours de cette thèse et leurs résultats.

I. CAS PARTICULIERS : CHOC SEPTIQUE

1. Définition et Epidémiologie

Le sepsis peut être défini comme une infection par un agent pathogène associée à une réponse inflammatoire systémique (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS). On parle d'un sepsis grave quand il existe au moins une défaillance d'organe associée ou une hypotension artérielle réversible par le remplissage vasculaire. Quand l'hypotension devient réfractaire malgré un remplissage d'au moins 20 mL/kg, le sujet pourrait être considéré en état de choc septique et nécessite l'introduction d'agents vasoactifs pour maintenir une pression de perfusion satisfaisante. Les critères d'évolution d'une simple infection à un choc septique sévère ont été élargis au cours d'une conférence de consensus international rassemblant Society of Critical Care Medecine (SCCM), European Society of Intensive Care Medecine (ESICM), American college of Chest Physicians (ACCP), American Thoracic Society (ATS), et Surgical Infection Society (SIS) (cf. Tableau 1). Ces pathologies sont la conséquence d'une dysrégulation complexe et multifactorielle de la réponse de l'hôte à l'infection. Des réponses inflammatoire, immunitaire, métabolique, systémique et hémostatique vont être mises en jeu pour défendre l'organisme contre l'invasion massive de cet agent pathogène. Cependant ces mécanismes, eux-mêmes, sont à l'origine de dysfonctions et dommages tissulaires graves.

La prise en charge du sepsis sévère est très coûteuse, aux Etats-Unis, la durée moyenne d'hospitalisation était de 19,6 jours, pour un prix par patient de plus de 22 000 $, soit 17 000€. Malgré les dépenses pour la prévention et la prise en charge de cette pathologie, elle reste toujours associée à une lourde morbidité et mortalité. Pour la seule année 1995, plus de 750.000 patients ont été recensés aux États-Unis, pour une mortalité de 215 000 patients soit 28,6 % (Angus *et al.*, 2001). En France, une augmentation de l'incidence du sepsis a été observée: les admissions pour sepsis grave et choc septique en réanimation sont passées de 8,4 % en 1993 à 14,6 % en 2001. Le choc septique représente environ 3 à 4 % des admissions en réanimation chez l'adulte en France et reste la principale cause de décès dans les unités de soins intensifs non cardiologiques.

Dans la physiopathologie du choc septique, le premier évènement est la reconnaissance du pathogène par l'hôte, suivie par l'activation des voies intra-cellulaires conduisant à la synthèse des médiateurs de l'inflammation. Ces médiateurs vont activer et déclencher la synthèse de nouveaux médiateurs par les cellules du système immunitaire inné, notamment les monocytes, du système immunitaire acquis, notamment les lymphocytes CD4, et par les cellules endothéliales. Deux grands systèmes sont donc impliqués dans le sepsis : l'inflammation et la coagulation. Ces deux systèmes interagissent en permanence et contribuent probablement aux défaillances d'organes.

Term	Definition and criteria
1. Infection	Inflammatory response to the presence of micro-organisms or invasion of normally sterile tissue by these organisms
2. Bacteremia	Presence of viable micro-organisms in the blood
3. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)(1)	Two or more of the following: – temperature > 38 °C or < 36 °C; – Heart rate > 90 b/min; – Respiratory rate > 20 b/min, or $PaCO_2$ < 32 mm Hg; – White blood cell count > 12,000/mm^3, or < 4,000/mm^3, or > 10% band forms
4. Sepsis (= 1 + 3)	The systemic response to infection
5. Severe sepsis	Sepsis and organ dysfunction, hypoperfusion or hypotension Manifestations of hypoperfusion may include, but are not limited to: – lactic acidosis; – oliguria; – acute alteration in mental status
6. Septic shock (=5 + 7)	Sepsis-induced hypotension, persisting despite adequate fluid resuscitation,(2,3) and manifestations of hypoperfusion as listed in 5
7. Hypotension, sepsis-induced	A decrease in systolic blood pressure to < 90 mm Hg, or of > 40 mm Hg from baseline, in the absence of other cause for hypotension(3)

Tableau 1: Définitions des états inflammatoires et infectieux, adaptées d'après ACCP/SCCM
(Brun-Buisson *et al.* 2000)

(1) Le SIRS peut être causé par une variété de traumatismes : infection, pancréatite aiguë, brûlures…
(2) L'hypotension est considérée comme persistante si > 1h
(3) Les patients inotrope/agents vaso-actifs peuvent ne pas être hypotenseurs au moment de l'évaluation.

2. Relation hôte - pathogène

Le choc septique est le résultat de l'interaction entre l'agression bactérienne et la réponse de l'hôte. Cette réponse repose sur des composante innées et adaptatives et résulte de la capacité de ces micro-organismes à envahir l'hôte localement ou au niveau systémique. Les principaux antigènes microbiens susceptibles d'activer le système immunitaire sont l'acide lipoteichoïque pour les bactéries à Gram-positif, le lipopolisaccharide (LPS) ou endotoxine pour les bactéries à Gram-négatif (cf. Figure 3), des composants internes libérés par la lyse bactérienne tels que des protéines ou des fragments d'ADN, les glycolipides et les mycosiques pour les mycobactéries, les protéines des champignons et des parasites ainsi que certains constituants viraux (Roitt *et al.*, 1997).

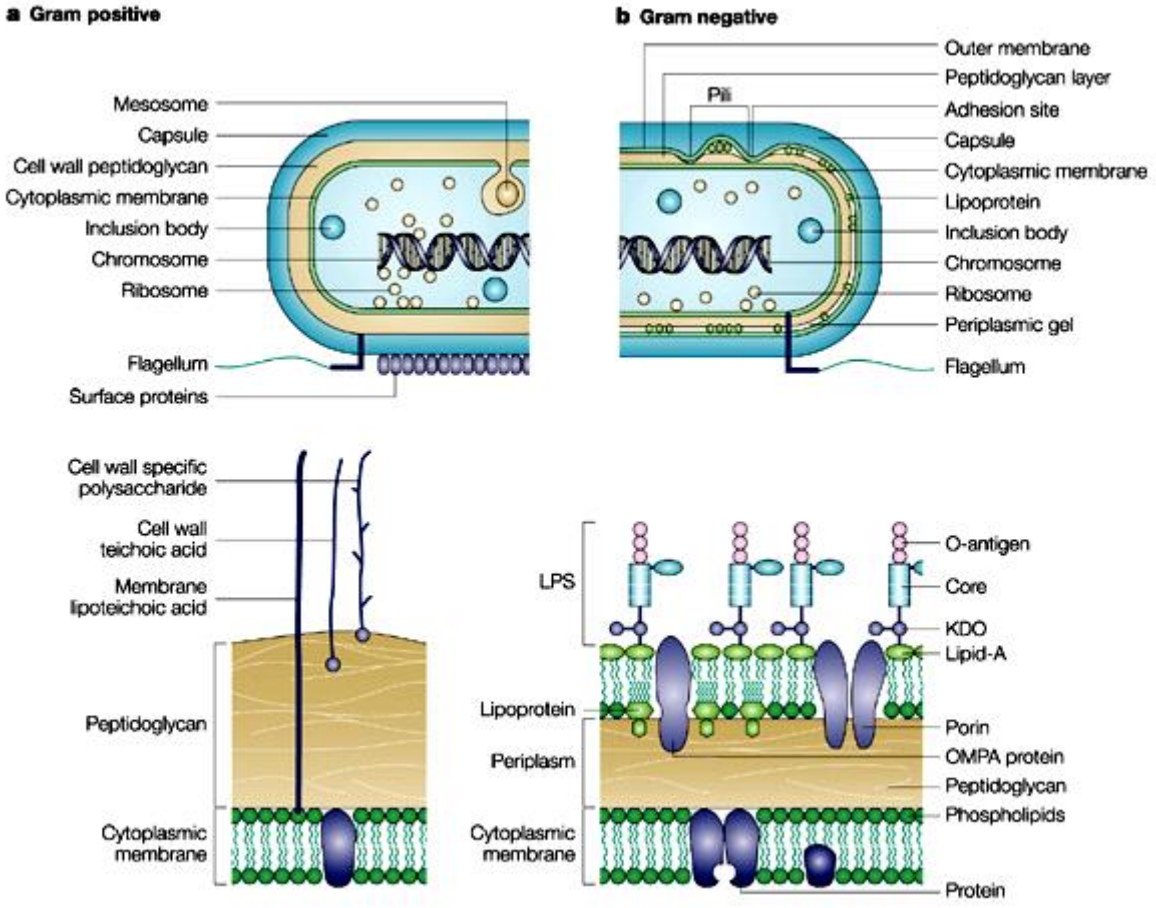


Figure 3: Présentation structurale de deux principales classes de bactérie
(Lolis et al. 2003)

KDO : 3-deoxy-D-manno-octulosonate ; LPS : lipopolysaccharide ; OMPA : outer membrane protein A

es

monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules immunitaires expriment à leurs surfaces des récepteurs spécifiques appelés *Pattern recognition receptors*

(PRR) (Gordon *et al*., 2002, Calandra *et al*., 2001). Les protéines membranaires *toll-like receptor* (TLR) et les protéines de reconnaissance intra-cytoplasmiques que sont les nucleotide-binding oligomerisation domain 1 et 2 (NOD) sont deux classes de protéines appartenant au groupe PRR et qui sont impliquées dans la détection des agents pathogènes.

3. Activation cellulaire

Après avoir reconnu leur ligand, les récepteurs activent à leurs tours différentes cascades de signalisation intracellulaire et l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. La fixation active le facteur nucléaire NF-κB entraînant l'activation cellulaire et la transcription de cytokines. Selon la classe de PRR, on distingue, principalement, deux voies d'activation de NF-κB au niveau membranaire comme au niveau intracytoplasmique respectivement par LPS et NOD.

- **Voie d'activation membranaire :**

Les TLR sont chargés de la reconnaissance des composés microbiens nommés *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Parmi ces structures moléculaires, le LPS libéré par la bactérie au niveau du site infectieux est rapidement capté par des protéines de transfert que sont les *Lipoprotein binding proteins* (LBP). Le complexe LPS-LBP se fixe à un récepteur de surface monocytaire de type CD14 qui présente le complexe au récepteur TLR de type 4 spécifique au LPS et qui est parmi les dix TLR reconnus chez l'homme. Chaque type de TLR possède de nombreux ligands possibles, endogènes ou exogènes (cf. Figure 4). Ainsi, le TLR1 reconnaît le triacyl des lipoprotéines, le TLR2 reconnaît le peptidoglycane des bactéries Gram-positif, le TLR3 reconnaît l'ARN viral double-brin, le TLR4 reconnaît le LPS, le TLR5 reconnaît les flagelles bactériens. Elles reconnaissent également des protéines endogènes comme les *Heat-shock proteins* (Hsp) ou des protéines de la matrice extracellulaire (Ohashi *et al.,* 2000). La fixation du ligand sur le *toll-like receptor* entraîne une modification structurelle du domaine intracellulaire TIR, provoquant l'activation de protéines intracellulaires, comme la MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*) responsable de l'activation de IKK-α et IKK-β, qui vont être phosphorylées et ainsi inactiver IκB. IκB est une protéine inhibitrice de NF-κB. IκB phosphorylée est dégradée par des protéasomes, NF-κB est libre de transloquer dans le noyau pour activer l'expression des gènes impliqués dans la réaction inflammatoire.

- **Voie d'activation intracytoplasmique :**

NOD1 et NOD2 (*Nucleotide binding oligomerization domain 1 and 2*) (cf. Figure 5) ont récemment été identifiés comme étant des PRR intracellulaires (Girardin *et al.* 2004) jouant un rôle important dans l'apoptose et dans la reconnaissance intracytoplasmique d'agents pathogènes. Ces protéines possèdent une extrémité C-terminale riche en leucine, un domaine central de liaison au nucléotide (*nucleotide binding* NBS) et une extrémité N-terminale avec un ou plusieurs domaines CARD (*caspase-activating and recruitement domain*), proches des protéines pro-apoptiques. NOD1 et NOD2 reconnaissent et différencient les bactéries Gram+ et Gram- par leur composant membranaire, le peptidoglycane (PGN). En effet, le troisième acide aminé du PGN est une lysine chez les bactéries à Gram+, alors que la lysine est remplacée par un acide aminé *meso-diaminopimelic acid* (DAP) chez les bactéries à Gram-. NOD1 va reconnaitre les bactéries à Gram négatif alors que NOD2 est un détecteur des bactéries à Gram négatif comme à Gram positif.

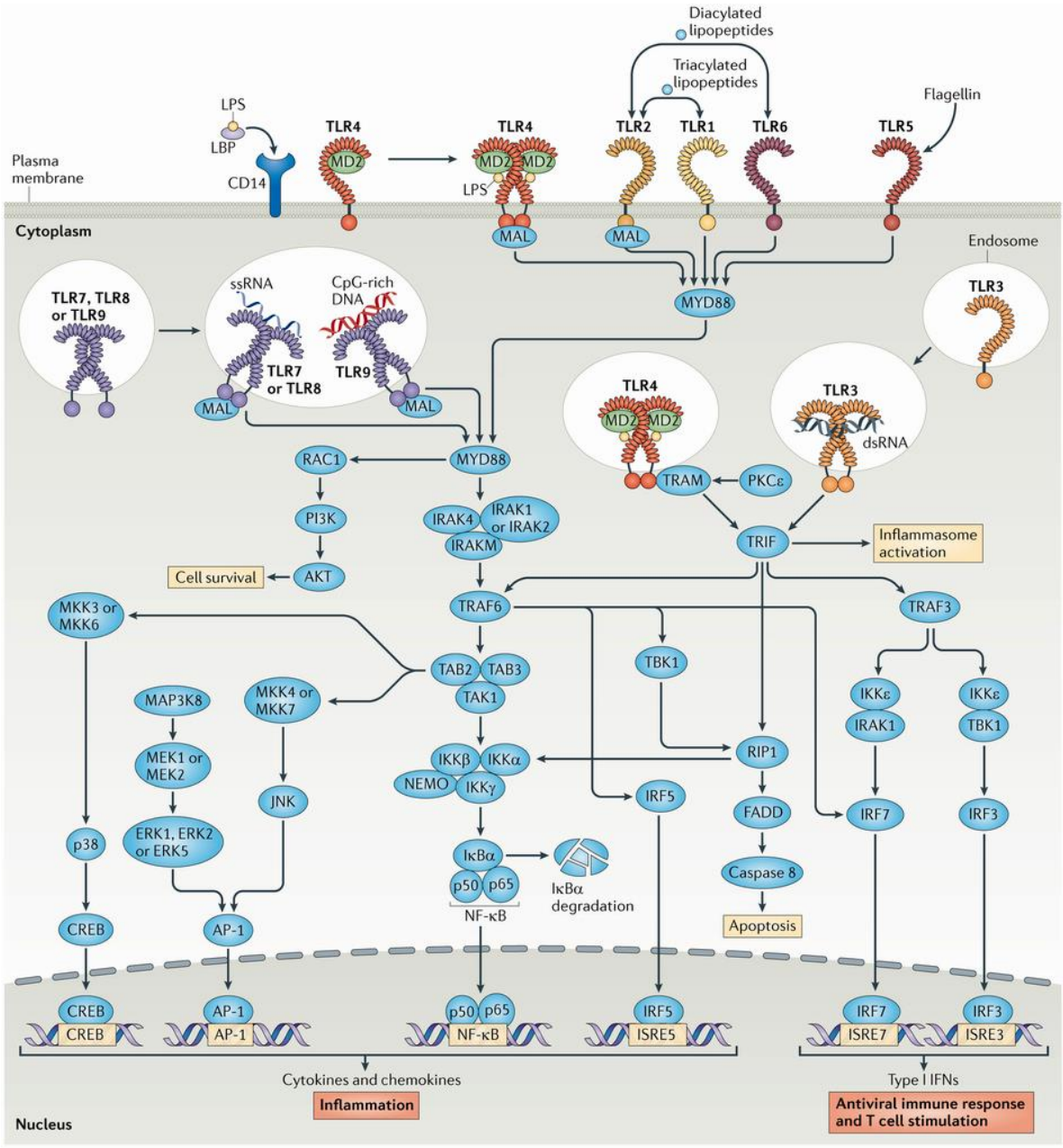


Figure 4: Voie de signalisation des protéines TLRs
(Gay *et al.* 2014)

Les récepteurs de type Toll Like receptor (TLRs) sont présents sur la surface des cellules et dans les endosomes , où ils détectent des composants microbiens de la paroi cellulaire. Après stimulation, les TLR activent deux types de voie qui impliquent la protéine MYD88 (myeloïd differenciation 88) et / ou la protéine TRIF (TIR-domain_containing adapter-inducing interferon-β). Les interactions avec d'autres voies de signalisation assure la transmission du signal des protéines TLR et conduit à l'apoptose ou à la survie cellulaire, et la transcription des cytokines pro -inflammatoires et des chimiokines, et les interférons de type I (IFN). AP-1, activator protein 1; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; dsDNA, double-stranded DNA; dsRNA, double-stranded RNA; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, FAS-associated death domain; IκBα, inhibitor of NF-κBα; IKK, inhibitor of NF-κB kinase; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, IFN-regulatory factor; ISRE, IFN-stimulated response element; JNK, JUN N-terminal kinase; LBP, LPS-binding protein; LPS, lipopolysaccharide; MAL, MYD88 adaptor-like protein; MAP3K, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8; MD2, myeloid differentiation factor 2; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; MKK, mitogen-activated protein kinase kinase; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nuclear factor-κB; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKCε, protein kinase Cε; RIP1, receptor-interacting protein 1; ssRNA, single-stranded RNA; TAB, TAK1-binding protein; TAK1, TGFβ-activated kinase 1 (MAP3K7); TBK1, TANK-binding kinase 1; TRAF, tumour necrosis factor receptor-associated factor; TRAM, TRIF-related adaptor molecule.

La liaison de NOD à son ligand va activer une protéine nommée RIP2, qui va interagir avec IKK-γ, sous unité régulatrice du complexe IKKγ et dont l'oligomérisation active IKK-α et IKK-β. Ces derniers vont phosphoryler IκBα, libérant ainsi NF-κB.

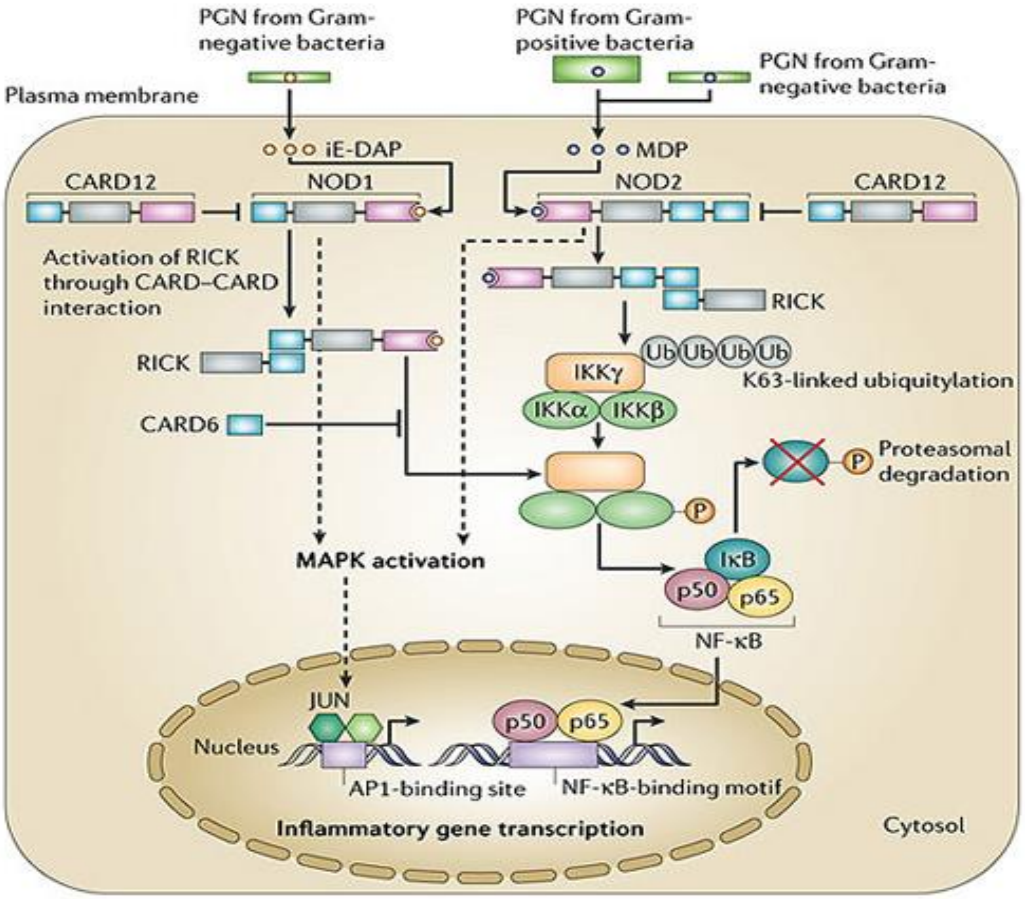


Figure 5: Voie de signalisation de NOD1 et NOD2.
(Strober *et al.* 2006)

La reconnaissance de muramyl dipeptide (MDP) et de γ-D- glutamyl -meso- diaminopimelic acid (iE-DAP) par le domaine leucine-rich repeat (LRR) active les protéines NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) NOD2 et NOD1 , respectivement , qui puis activent les récepteurs RICK (receptor-interacting serine/threonine kinase) par le domaine CARD (caspase-recruitment domain). Dans le cas de NOD2, l'activation de RICK conduit à l'activation de la protéine K63qui va interagir avec IKKγ, qui consiste également à IKKα et IKKβ. Ceci est suivi par la phosphorylation de IKKβ , ainsi que la phosphorylation de IκB et la libération du facteur nucléaire -κB (NF-κB) pour la translocation vers le noyau.
Dans le cas de NOD1, la phosphorylation de IKKγ par RICK n'a pas été étudié, et le mécanisme de l'activation de NF-κB n'est pas clair. CARD12 régule négativement l'activation de NF-κB par NOD1 et NOD2, alors que CARD6 régule négativement l'activation de NF-κB seulement par NOD1. En plus de l'activation de NF-κB, la signalisation de NOD1 et NOD2 donne lieu à l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), tels que JNK (JUN amino -terminal kinase), ERK (extracellular-signal-regulated-kinase) et p38MAPK.. AP1, activator protein 1; PGN, peptidoglycan.

La liaison des PAMPs aux PPRs, notamment TLR et NOD, va permettre la phosphorylation des inhibiteurs de NF-κB. En effet, l'activation et la transcription nucléaire

de NF-κB va conduire à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et le sepsis comme :

- Gènes codant pour des molécules d'adhésion ; *endothelial leukocyte adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, intercellular adhesion molecule, P-selectin*
- Gènes codant pour des chemokines ; Il-8
- Gènes codant pour des cytokines ; Il-1, Il-2, TNF-α, Il-12
- Gènes codant pour des protéines impliquées dans la présentation de l'antigène
- Gènes codant pour les molécules du complexe majeur d'histocomptabilité

4. Action des médiateurs de l'inflammation

En présence de l'agent pathogène, de nombreux médiateurs sont libérés : cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui jouent un rôle central dans la réponse de l'hôte à la septicémie.

4.1. Médiateurs pro-inflammatoires

Une augmentation de la concentration de nombreux médiateurs pro-inflammatoires a été signalée dans le plasma des patients en choc septique ou dans celui de volontaires sains après injection de LPS. Il s'agit de chémokines comme l'IL-8, de cytokines comme le tumor necrosis factor TNF-α, l'IL-1β, l'IL-18, l'interféron-γ (INF-γ) (Waage *et al.*, 1986). Ces médiateurs sont synthétisés par les macrophages activés et les lymphocytes CD4.

- **Les chémokines** ; cette famille regroupe les différents cytokines qui possèdent toutes en commun un pouvoir chimiotactique, c'est-à-dire la capacité à recruter et à activer les cellules circulantes, comme les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les polynucléaires basophiles, neutrophiles et éosinophiles, sur le site inflammatoire.

- **Les cytokines** Cet état infectieux se caractérise par une exacerbation de l'inflammation, avec une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, qui contribuent au développement de dommages tissulaires, et sont détectées dans les liquides biologiques. Ils sont capables d'entretenir leur propre sécrétion, mais également la sécrétion de nombreuses

autres molécules, comme des médiateurs lipidiques, des radicaux libres de l'oxygène, du monoxyde d'azote, ou encore d'induire des phénomènes apoptotiques :

- Les cytokines pro-inflammatoires induisent la production de phospholipase A2, de cyclo-oxygénase 2 (COX-2), et d'acyltransférase contribuant à la sécrétion des médiateurs lipidiques comme les eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) ou le platelet activating factor. Ces facteurs sont impliqués dans la physiopathologie des dysfonctions d'organe, en particulier la dysfonction vasculaire du sepsis en provoquant, après l'altération de l'endothélium, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, une vasodilatation, une hypertension artérielle pulmonaire, ou encore une agrégation plaquettaire.

- Les radicaux libres peuvent être formés par les leucocytes recrutés sur le foyer infectieux ou par la cellule endothéliale elle-même. Par ailleurs, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales favorise leur activation et les sensibilise à l'action de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF-α. Cela entraîne une libération massive par les leucocytes de radicaux libres une à trois heures après leurs expositions (Nathan *et al.,* 1986).

- Le TNF-α fut la première cytokine détectée dans le plasma de patients présentant des infections graves (Waage *et al.* 1986). Il va également stimuler la production d'iNOS, ayant pour conséquence une augmentation de monoxyde d'azote (NO). Le NO diminue le tonus vasomoteur et diminue les résistances vasculaires. Le TNF-α favorise la production par les polynucléaires neutrophiles de radicaux libres et de protéases, à l'origine de lésions tissulaires.

- **Le PAF** (***Platelet activating factor***) est un lipide exprimé à la surface des cellules endothéliales. Il est responsable d'une activation des plaquettes et sert de costimulateur à l'adhérence des neutrophiles sur les cellules endothéliales. Il est absent à la surface de l'endothélium au repos et se forme dans les quelques minutes qui suivent une stimulation des cellules par la thrombine, l'histamine ou les leucotriènes C4. La production de radicaux libres toxiques au cours du stress oxydant par les polynucléaires, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes stimulés par les cytokines contribue à l'activité microbicide mais altère les structures protéiques et la perméabilité capillaire. L'activation endothéliale par les médiateurs de l'inflammation entraîne une modification des jonctions serrées de l'endothélium. Il en résulte une séquestration liquidienne dans le secteur interstitiel et une hypovolémie.

- **Le *Macrophage migration inhibitory factor*** (**MIF**) est présent à l'état basal dans le plasma, mais sa concentration plasmatique augmente au cours du sepsis. Elle est produite par de nombreuses cellules, par exemple les lymphocytes B, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules pituitaires. Le MIF favorise le développement de la réaction inflammatoire en augmentant l'expression des cytokines pro-inflammatoires, et celle de TLR4 et comme agoniste des effets des glucocorticoïdes. En effet, il existe des relations importantes entre le métabolisme des glucocorticoïdes et le MIF, puisqu'il a été démontré que des injections de petites quantités de glucocorticoïdes ramenaient les valeurs de MIF à celles observées à l'état basal (Maxime *et al.*, 2005, Calandra *et al.*, 2000).

- **La *High mobility group protein I*** (**HMGB1**), protéine nucléaire de liaison à l'ADN est produite par les macrophages. Elle se lie à des récepteurs extracellulaires des cellules endothéliales et active une cascade intracellulaire, *via* les MAP-kinases, facilitant la transcription de NF-κB et d'autres MAP-kinases. Il a aussi une action sur la synthèse de facteurs pro-inflammatoires par les monocytes (Andersson *et al.*, 2000). Dans les cellules endothéliales, HMGB1 induit l'expression de VCAM-1, ICAM-1, comme la synthèse de TNF-α, IL-8, PAF (Fiuza *et al.*, 2003). HMGB1 augmente la perméabilité des entérocytes et facilite ainsi les translocations bactériennes chez les souris (Sappington *et al.*, 2002). L'éthyl pyruvate, qui inhibe la production de HMGB1 *in vivo*, a montré son efficacité sur la réduction de la mortalité dans des modèles animaux (Ulloa *et al.*, 2002). D'autres agents bloquant l'activité de HMGB1 au cours du sepsis ont été testés, montrant la même efficacité (Yang *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que HMGB1 serait une cible thérapeutique intéressante au cours du sepsis.

4.2. Médiateurs anti-inflammatoires

A l'opposé des mécanismes pro-inflammatoires, des processus de contre-régulation sont mis en jeu pour aboutir à une résolution de l'inflammation, en vue d'une restauration d'un équilibre immunologique, et idéalement, de la restitution complète de l'intégrité tissulaire.

Le sepsis s'accompagne de l'augmentation de nombreuses cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-10 (Brandtzaeg *et al.*, 1996), IL-13, TGF-β (*transforming*

growth factor β), les récepteurs solubles du TNF-α (sTNFR). Ces médiateurs peuvent avoir des effets variables. Ainsi, ils vont diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Il-1, TNF-α, Il-6, et Il-8) et d'autres chémokines par les monocytes/macrophages activés, en s'opposant à l'induction de certaines activités pro-inflammatoires générées par l'Il-1 et le TNF-α (comme la production des RL ou l'induction de NOSi), ou encore en induisant des phénomènes apoptotiques au niveau des polynucléaires neutrophiles lors de la phase de résolution de l'inflammation. De plus elles favorisent la production de l'antagoniste naturel du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) (Granowitz *et al*.1991) en bloquant la liaison à son récepteur cellulaire.

Au cours du sepsis, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF sont capables de stimuler l'axe hypothalamo-hypophysaire et la synthèse de CRF (*Cortico releasing factor*) et d'hormone adrénocorticotrope (ACTH), provoquant une majoration de la synthèse surrénalienne de cortisol. Le cortisol, glucocorticoïde naturel, est un puissant anti-inflammatoire qui diminue la synthèse de diverses cytokines au niveau transcriptionnel, en inhibant l'expression de NOSi, de COX-2, de NADPH oxydase, des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, et en diminuant le chimiotactisme. Parallèlement à cet axe hypothalamus-hypophyse-surrénal, le système nerveux autonome permet également une modulation de la réponse inflammatoire. En effet, il a été observé une diminution de l'activité sympathique au profit de l'activité parasympathique au cours du sepsis qui est responsable à la sécrétion des catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline. Ces hormones inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires IL-2, le TNF-α et l'IFN-γ par les cellules présentatrices d'antigène Th1 en diminuant leurs activités, et stimulent la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 par les cellules Th2 en stimulant leurs activités (Elenkov *et al*., 2000).

Les interactions complexes existant entre les réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires peuvent expliquer l'échec des thérapeutiques ciblant un médiateur unique ou dont le but est de supprimer l'inflammation de façon non spécifique.

4.3. L'interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 possède des propriétés pro et anti-inflammatoires. La concentration plasmatique d'IL-6 est directement corrélée à l'activation de l'axe hypotalamo-hypophysaire (Silva *et al*.,

2002). En effet, sa synthèse est diminuée après injection de glucocorticïdes. Cette cytokine est sécrétée précocement après injection de LPS, de TNF-α et d'IL-1. Elle stimule la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires tels que le TGF-β, les TNFR ou Il-1Ra. Elle diminue la synthèse des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et d'IL-1. L'IL-6 favorise la synthèse de molécules d'adhésion comme ICAM, le recrutement des leucocytes et la synthèse de PAF par les macrophages. L'IL-6 est également impliquée dans la rupture de la barrière épithéliale digestive au cours du choc hémorragique (Yang *et al.*, 2003).

5. Activation de l'inflammation et de la coagulation

L'interaction entre l'inflammation et la coagulation aboutit à un état de vasoplégie, d'hyporéactivité et d'hyper-coagulabilité importante. L'endothélium semble être le lieu d'interaction de ces deux grands systèmes puisqu'il présente l'interface entre les tissus et les cellules de l'inflammation circulantes.

5.1. Endothélium et inflammation

L'adhésion leucocytaire, indispensable à la migration des leucocytes vers la zone inflammatoire, fait intervenir des phénomènes de liaison des cellules circulantes aux cellules endothéliales. Les intégrines leucocytaires, les molécules LFA-1, CR3 et p150-95, qui sont présentes à la surface des lymphocytes, des monocytes et des neutrophiles sont parmi les principales molécules impliquées dans les phénomènes d'adhérence. Ces molécules se lient aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de ligands. Ainsi la molécule LFA-1 a pour ligand les molécules ICAM-1 et ICAM-2. A la suite des phénomènes d'adhésion, les cellules vont passer la barrière endothéliale pour migrer vers les tissus de la zone inflammatoire en réponse à des signaux que constituent les chémokines. Les leucocytes recrutés sur le foyer inflammatoire sont localement activés et participent à l'entretien du processus inflammatoire (cf. Figure 6).

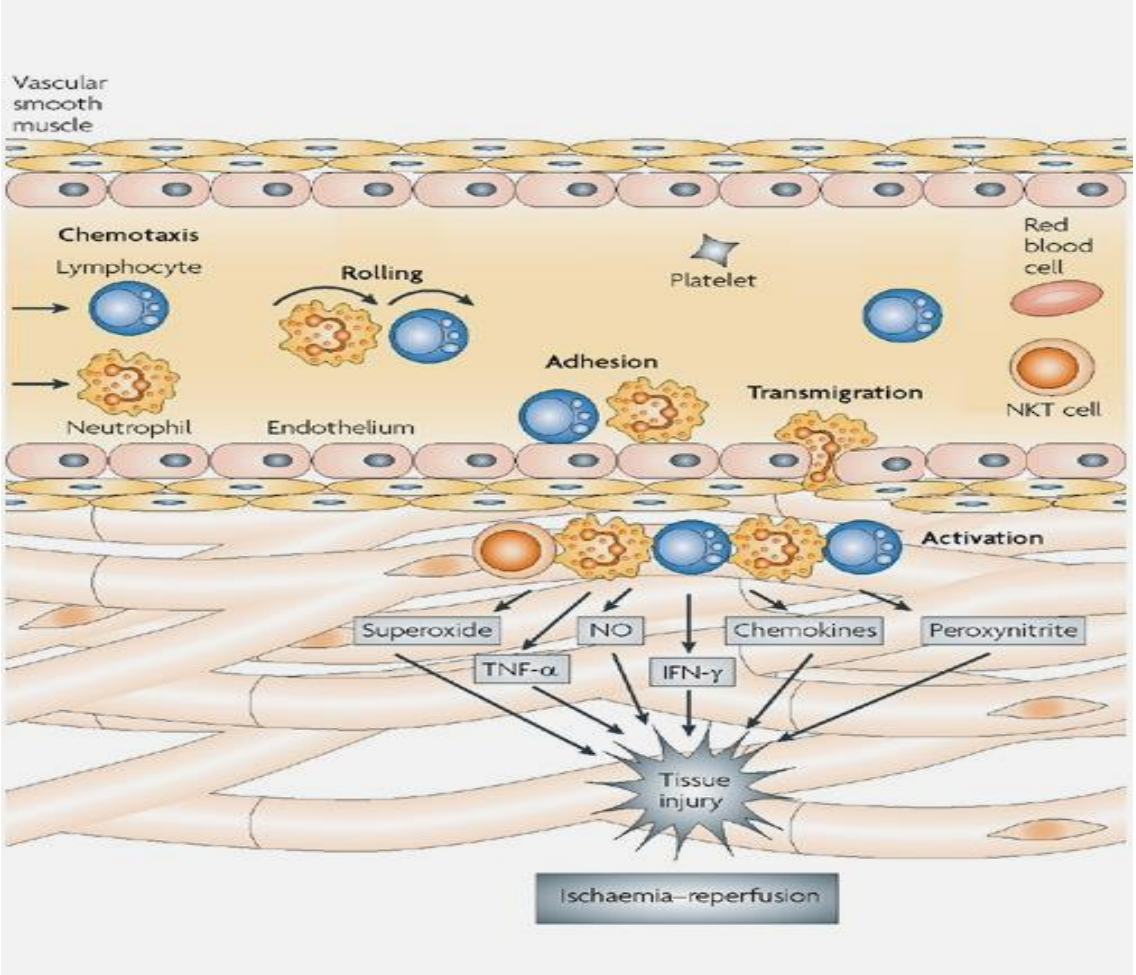


Figure 6: Mécanisme d'interaction des cellules endothéliales avec l'inflammation au cours du sepsis
(Hasko *et al.*, 2008)

Au cours du sepsis, des différentes cellules inflammatoires sont recrutées pour interagir avec l'endothélium à l'aide des récepteurs membranaires. Après Roulement, Adhésion et Transmigration, les cellules immunitaires, dont les lymphocytes et les neutrophiles, migrent vers les tissus de la zone inflammatoire. Les cellules immunitaires recrutées sur le foyer inflammatoire sont localement activées et participent à la production des médiateurs de l'inflammation. NO, nitric oxide ; TNF-α, tumor-necrosis factor-α.

5.2. Endothélium et coagulation

L'endothélium a normalement un rôle anticoagulant et pro-fibrinolytique. Au cours du sepsis, l'endothélium perd ces caractères et devient procoagulant et antifibrinolytique. De ce fait, l'endothélium est responsable de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) suite à l'activation de la coagulation et la diminution des systèmes anticoagulants. Dans le cadre du sepsis, l'activation de la cascade de coagulation se produit après un remaniement membranaire des cellules endothéliales conduisant à l'externalisation du facteur tissulaire

(FT) (Bevilacqua *et al.*, 1986). Le facteur tissulaire exprimé à la surface des cellules endothéliales ou monocytaires se lie au facteur VII activé. Il en résulte un complexe facteur tissulaire-facteur VIIa qui active la thrombinoformation par le biais des facteurs de la voie commune de la coagulation V et VIII. La thrombine transforme le fibrinogène en monomères de fibrine. Ces monomères se polymérisent et forment un thrombus. Les plaquettes, les facteurs de coagulation et le fibrinogène sont consommés dans la formation de ce thrombus. Le sepsis est aussi lié à une forte consommation des anticoagulants naturels tels que l'antithrombine III et les protéines C et S conduisant à une diminution des systèmes anti-coagulants (Russel *et al.*, 2006) (cf. Figure 7). Ainsi, l'activation des complexes thrombine/antithrombine par un agent pathogène, suite à la fixation de l'antithrombine III, entraîne une diminution de l'activité de l'activateur tissulaire du plasminogène et une augmentation de la synthèse de facteur tissulaire, donc une diminution de la fibrinolyse physiologique, permettant ainsi la formation de thrombine et de fibrine (Levi *et al.*, 1993). Le sepsis provoque aussi une diminution de l'expression de thrombomoduline et du récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) à la surface des cellules endothéliales nécessaires pour la liaison de la protéine C à la thrombine et ainsi l'inhibition de la formation du thrombus. La protéine C inactivée résulte d'une augmentation de la thrombine libre et participe à la formation du thrombus (Lentz *et al.*, 1991).

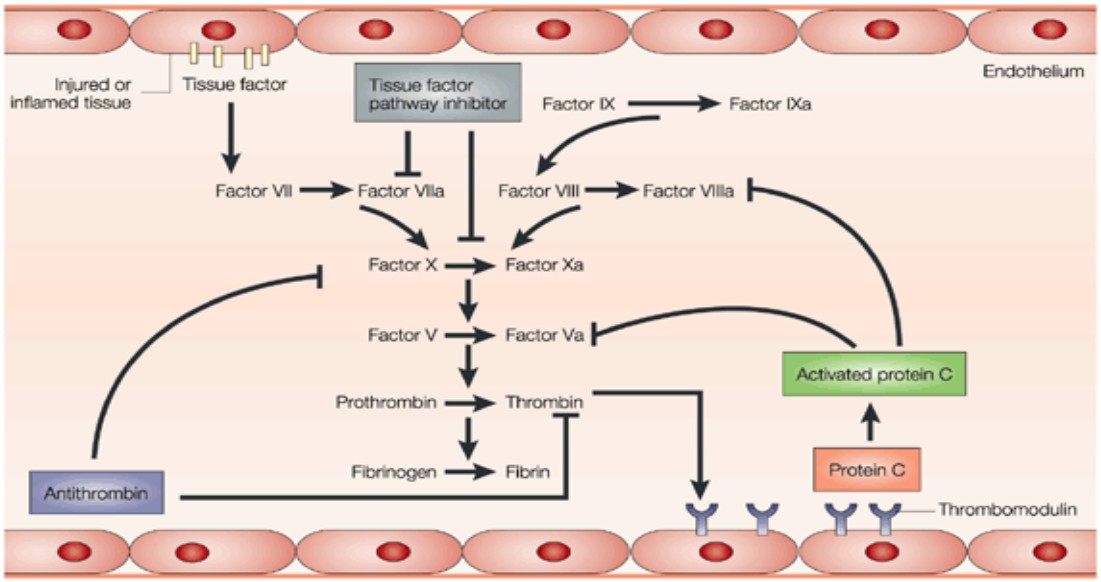


Figure 7: La cascade de coagulation dans le sepsis
(Marshall, 2003)

Le sepsis initie la coagulation par des modifications des propriétés de l'endothélium et l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire. La stimulation de l'activation de Facteur VII conduit à la formation du facteur VII activé. Le complexe facteur tissulaire -facteur VIIa catalyse ensuite la conversion du facteur X en facteur Xa, ce qui entraîne de manière séquentielle ; l'activation du facteur V, la conversion de la prothrombine en thrombine, et la conversion du fibrinogène en fibrine. La protéine C est activée par l'intermédiaire de son interaction avec la thrombomoduline à la surface cellulaire et inhibe l'activité de facteurs V et VIII. L'antithrombine bloque l'activation de facteurs XII, XI, IX, et X, tandis que l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire interfère directement avec le complexe facteur tissulaire - facteur VIIa.

L'activation de la coagulation a pour conséquence la formation de micro-thrombi au sein de la microcirculation (Asaka *et al.,* 1996) et finalement la défaillance d'organes (Vervloet *et al.,* 1998). Les troubles de l'hémostase dans les états septiques sont très fortement liés à l'état inflammatoire systémique (Esmon *et al.,* 1991). En effet, la liaison de la thrombine à son récepteur conduit à l'activation de NF-κB, à la transcription de gènes pro-inflammatoires et à la synthèse de NO (Kang *et al*., 2003), ce qui contribue à la vasoplégie présente dans le choc septique. Le vaisseau septique est en vasoplégie et n'est plus capable d'adapter son tonus aux stimuli locaux, en particulier aux modifications du débit de perfusion, de la pression endoluminale, ou des apports en oxygène. On voit donc qu'au cours du sepsis, un cercle vicieux entre la lésion endothéliale et la réaction inflammatoire se constitue et se traduit par des thromboses microvasculaires résultant en une hypoperfusion, une ischémie et enfin une défaillance de plusieurs organes (cf. Figure 8).

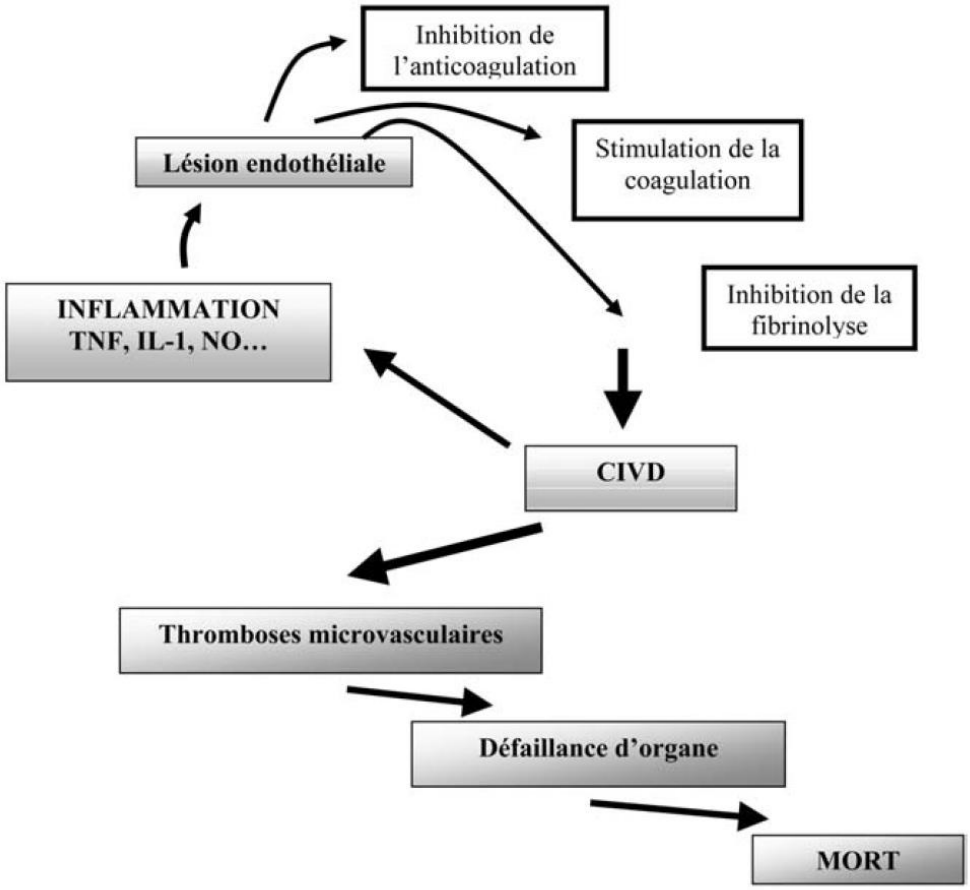


Figure 8: Relation entre inflammation et coagulation
(Leone *et al.,* 2003)

6. Conséquences cliniques importantes

6.1. Insuffisance circulatoire

L'insuffisance circulatoire du choc septique est le résultat des troubles hémodynamiques majeurs. En effet, elle est responsable d'une altération de la vasorégulation et des altérations de la microcirculation avec une diminution de la perfusion capillaire. Les modifications fonctionnelles de la cellule endothéliale sont des phénomènes centraux de ces altérations (Vallet *et al.,* 2002). Cette insuffisance circulatoire se traduit dans un état d'hyperkinésie avec débit cardiaque conservé ou élevé et résistances vasculaires systémiques basses en rapport avec la vasoplégie.

Le choc septique se caractérise par des troubles de la vasomotricité, suite à un déséquilibre entre les molécules vasoactives produites par les cellules endothéliales, et par la résistance aux agents naturels, sécrétés lors d'une agression infectieuse (adrénaline, noradrénaline, angiotensine). Cette hyporéactivité semble liée à la sécrétion par l'endothélium vasculaire de puissants vasodilatateurs tels que NO (Sharshar *et al*., 2003).

L'hyperperméabilité capillaire et veinulaire du sepsis et les thromboses microvasculaires disséminées ne permettent pas à l'oxygène d'être extrait du vaisseau pour atteindre les cellules cibles, entraînant une inadéquation entre les besoins et la demande en oxygène et conduisant à une hypoxie tissulaire qui est à l'origine d'une défaillance d'organe. Cet état conduit à des troubles de la microcirculation, qui peuvent être présents même en présence d'une hémodynamique satisfaisante, comme le montrent les travaux de Ince (Spronk *et al.,* 2004) Des techniques d'imagerie comme l'OPS (*Orthogonal Polarization Spectral*) ou la SDF (*sublingual sidestream dark field*) permettent de mettre en évidence de telles anomalies de la microcirculation.

6.2. Défaillance d'organe

La gravité du choc septique est le fait de l'émergence du syndrome de défaillance multiviscérale (cf. Figure 9). La pathogenèse de cette dysfonction est multifactorielle. L'hypoperfusion tissulaire et l'hypoxie, liés aux troubles hémodynamiques de la macro et de

la microcirculation sont les facteurs dominants. Des médiateurs tels que TNF, IL-1, le NO et les radicaux libres pourraient inhiber la chaine respiratoire mitochondriale et ainsi diminuer la sécrétion d'ATP responsable de la dysfonction d'organe (Singer *et al*., 2004, Brealy *et al*., 2002). Par ailleurs les médiateurs anti-inflammatoires altèrent le fonctionnement du système nerveux autonome interrompant la communication inter organes physiologique pouvant être responsable à la défaillance multiviscérale (Sharshar, 2003, Golden *et al.*1996). Cette atteinte conduit principalement aux modifications cardiovasculaires, pulmonaires, rénales, hématologiques, et aux dommages tissulaires.

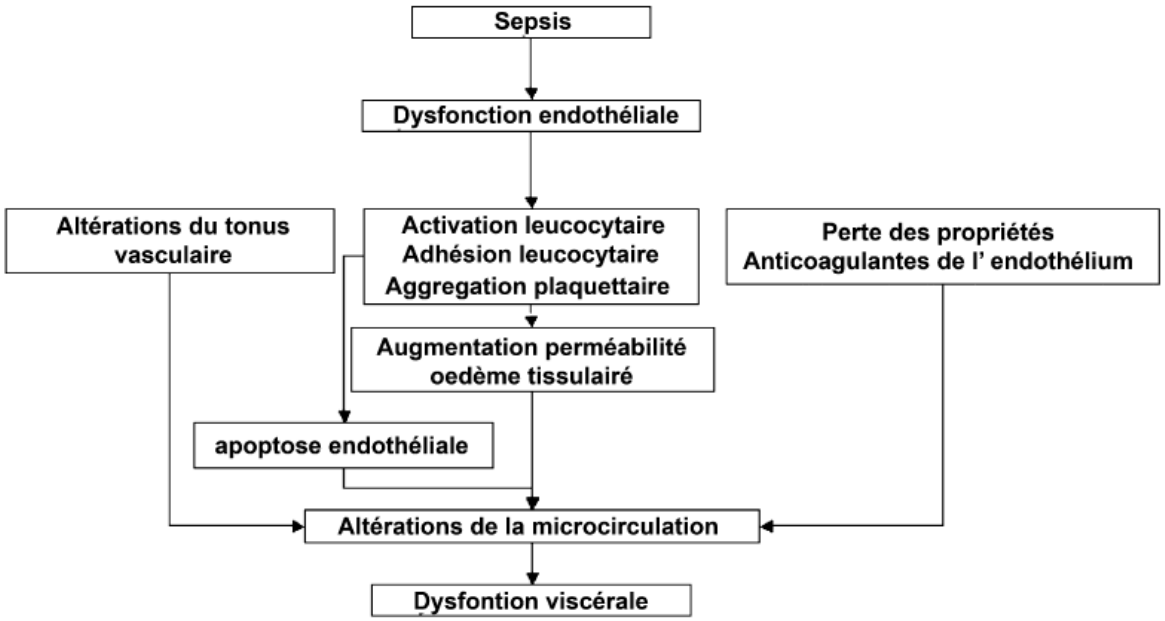


Figure 9: Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par le sepsis
(Huet *et al.*, 2008)

Lors des états septiques sévères réanimés, s'ajoutent aux précédents mécanismes des troubles liés aux phénomènes d'ischémie/reperfusion qui contribuent de manière majeure aux lésions et aux défaillances. Les réactions anti-inflammatoires et immunosuppressives, notamment de l'immunité adaptative, sont elles aussi, excessives ou dysfonctionnelles, entraînant un état d'immunosuppression favorisant les infections nosocomiales tout en échouant dans le maintien de l'homéostasie (Wang *et al.*, 2008, Cohen, 2002). L'atteinte se situe également au sein de la machinerie cellulaire avec une dysfonction mitochondriale septique entraînant un trouble direct de l'utilisation cellulaire de l'oxygène.

II. CAS PARTICULIERS : CHOC HEMORRAGIQUE

1. Définition et Epidémiologie

Le choc hémorragique est lié à une insuffisance circulatoire aiguë suite à la baisse du flux sanguin efficace. La perte de la masse sanguine circulante se traduit par une chute de la volémie et du débit cardiaque conduisant à une baisse de l'hémoglobine et donc à une baisse de l'apport d'oxygène aux tissus. La première réponse à l'hémorragie est la stimulation du système sympathique dans le but de redistribuer le volume sanguin restant en faveur des organes vitaux que sont le cerveau et le cœur (Cabrales *et al.*, 2006). Cette réponse adaptative provoque néamoins une hypoperfusion des territoires vasculaires périphériques, splanchniques, rénaux et musculo-cutanés, avec une diminution des apports énergétiques vers ces régions. L'hypotension constatée reflète un état d'hypoxie et d'une altération fonctionnelle cellulaire et tissulaire importante. En effet, ces lésions ischémiques peuvent être majorées par le développement d'une réaction inflammatoire et immunologique précoce, contribuant au syndrome de défaillance multi-viscérale. Durant la réanimation, la production des médiateurs toxiques (Radicaux Libres Oxygénés [ROS]) lors de la reperfusion des territoires ischémiques contribue aussi à l'aggravation de l'état de choc.

Les étiologies les plus fréquentes des chocs hémorragiques sont les traumatismes (plaies vasculaires, hémothorax, rupture d'organe plein intra-abdominal, traumatisme grave du bassin, poly-fractures des os longs), première cause de mortalité, les interventions chirurgicales dites « lourdes » et les hémorragies digestives. Toutes ces étiologies engagent rapidement le pronostic vital. Il dépend de la durée et de la gravité du choc, et par conséquent de la rapidité du diagnostic et du délai de mise en route d'un traitement approprié. L'hémorragie aiguë demeure une des premières cause de mortalité en traumatologie et ce malgré les progrès réalisés dans la prise en charge pré- et intra-hospitalière de ces patients. Ainsi, dans une série de 208 patients en état de choc hémorragique collectée par Heckbert *et al.*, 31% sont décédés après 2 heures, 12% entre 2 et 24 heures et 11% après les 24 premières heures, Seuls 46% de ces patients ont survécu (Heckbert *et al.*, 1993). Stewart *et al.* ont analysé une série de 753 décès, 52% des décès sont survenus dans les 12 premières heures, 74% dans les 24 premières heures et 86% dans les sept jours (Stewart *et al.*, 2003).

Ainsi, la physiopathologie du choc hémorragique est un mécanisme complexe, basé sur les interactions entre les réponses neuro-humorales induites par la baisse brutale du volume sanguin circulant et la réponse inflammatoire déclenchée par les lésions traumatiques et ischémiques, puis par la reperfusion et ses conséquences. Les lésions cellulaires sont d'autant plus importantes que la durée et l'intensité du choc sont prolongées. Le traitement consiste à rétablir un apport en oxygène adapté aux besoins cellulaires.

2. Mécanismes mis en jeu au cours du choc hémorragique

2.1. Réponse sympathique (neuro-hormonale)

Le retour veineux s'effectue à partir des veines périphériques vers les cavités droites du cœur selon le gradient de pression qui règne entre ces deux compartiments. Dans le cas d'une hémorragie, la diminution du volume sanguin circulant a pour conséquence une baisse du retour veineux. Il en résulte une diminution des pressions de remplissage des deux ventricules associé à une réduction immédiate du débit cardiaque et du volume systolique. La première répercussion clinique est la chute de la pression artérielle (PA) systolique. Ainsi les mécanismes de régulation de pression artérielle entrent en jeu très rapidement pour limiter les effets de la baisse du retour veineux sur la pression artérielle et maintenir un débit sanguin régional adapté à la perfusion des organes vitaux (Vatner *et al*., 1974). La première réponse à l'hémorragie est la stimulation du système sympathique qui entraîne une vasoconstriction artériolaire et veineuse médié par voie neuro-hormonale. Dans un deuxième temps, lors du dépassement de ces mécanismes temporaires, une chute brutale de la PA associée à une baisse des résistances vasculaires systémique (RVS) due à une sympatho-inhibition. (Schadt *et al*., 1991) (cf. Figure 10).

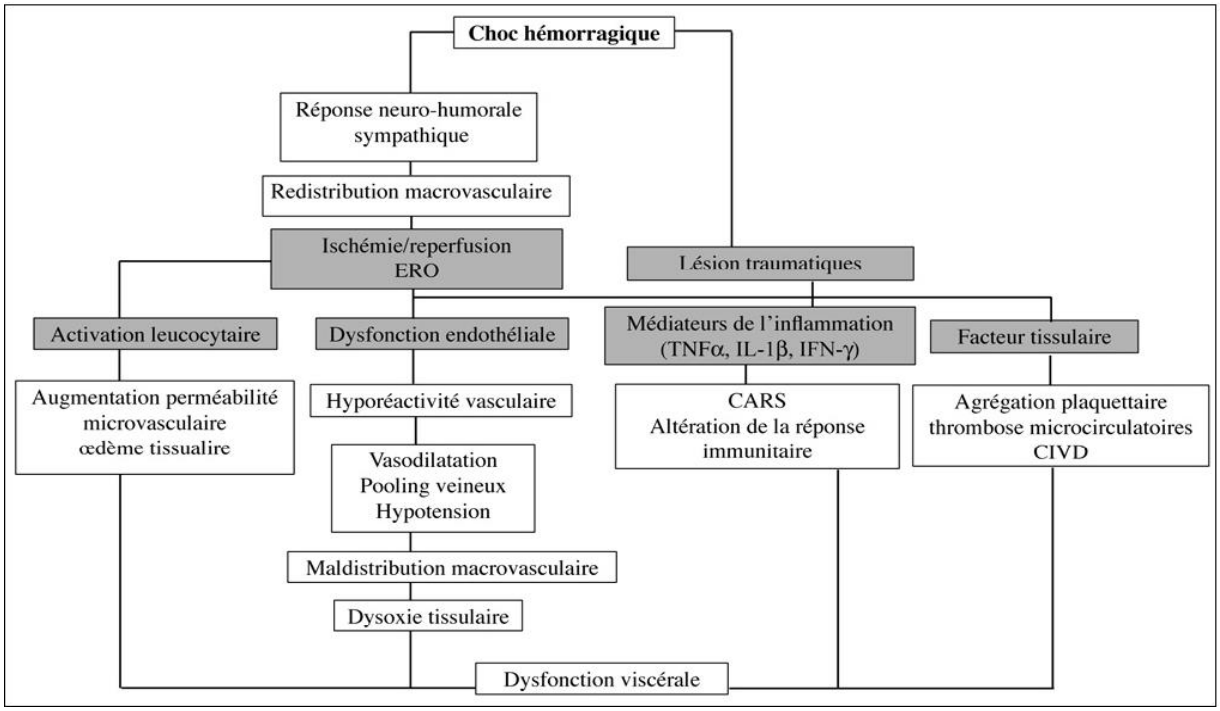


Figure 10: Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans le choc hémorragique
(Duranteau 2005)

(CARS: *compensatory anti-inflammatory response syndrome*; CIVD: coagulation intra-vasculaire disséminée).

2.1.1 La phase sympatho-excitatrice

Dans une situation normotensive, un tonus nerveux en provenance des afférences baro-réflexes stimule en permanence un noyau bulbaire, le noyau du tractus solitaire (NTS) bulbaire, qui a son tour, active les neurones parasympathiques et inhibe les neurones sympathiques (Bond *et al.*, 1985, Koyama *et al.*, 1988).

La réduction du volume sanguin par l'hémorragie, conduit l'organisme à une situation hypotensive progressivement, initialement marquée par une baisse le PA. Cette baisse de pression provoque une stimulation immédiate des barorécepteurs à haute pression situés au niveau du sinus carotidien, de la crosse aortique, du territoire splanchnique, et des barorécepteurs à basse pression cardio-pulmonaires (ou volorécepteurs) (Schadt *et al*., 1991). Ces récepteurs diminuent alors la fréquence de leurs impulsions inhibitrices afférentes (Bond *et al*., 1985). Les afférences, que ce soient celles des barorécepteurs à haute ou à basse pression, qui empruntent respectivement le trajet du vague et du glosso-pharyngien, font relai au niveau du centre régulateur vasculaire le NTS. Il se produit alors une diminution de

l'inhibition exercée par le NTS sur les efférences sympathiques, conduisant à l'augmentation de l'activité sympathique périphérique efférente (augmentation de l'inotropisme, du chronotropisme, vasoconstriction artérielle et veineuse et stimulation du système rénine-angiotensine) et diminution du tonus vagal parasympatique participant à l'augmentation de la fréquence cardiaque (tachycardie) (Sethi *et al.,* 2003). La vasoconstriction secondaire à cette stimulation sympathique se développe précocement aux dépens de la circulation musculocutanée et splanchnique. La vasoconstriction de ces territoires participe à une optimisation par l'organisme afin de préserver temporairement le fonctionnement de certains organes vitaux (Schlichtig *et al*., 1991). Initialement, les circulations coronaires, cérébrales et rénales sont privilégiées afin d'assurer leurs besoins métaboliques lors de cette première phase d'hypotension. Ensuite, avec le maintien de l'hémorragie (30% du volume circulant), la circulation rénale, elle aussi, subit une vasoconstriction pour permettre une meilleure redistribution du débit cardiaque et transport artériel en oxygène vers les organes vitaux.
Le système nerveux sympathique est également stimulé par les variations de pH, PaO_2, (pression artérielle en oxygène) et $PaCO_2$ (pression artérielle en dioxyde de carbone) secondaires à l'ischémie tissulaire qui stimule les chémorécepteurs aortiques, sino-carotidiens et centraux.

Au cours de cette phase initiale de choc hémorragique, les facteurs hormonaux sont peu impliqués et ne contribuent pas au maintien de la perfusion, à l'exception du système rénine-angiotensine où l'angiotensine II joue un rôle vasoconstricteur. Ainsi, les baro-, volo- et chémorécepteurs répondent de manière synergique à l'hypotension artérielle en activant le système nerveux adrénergique périphérique afin d'initier une vasoconstriction périphérique compensatrice. L'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (Landry *et al.,* 2001) renforce l'effet vasculaire du système sympathique et favorise la réabsorption hydrosodée. L'élévation du taux de catécholamines sériques permet le maintien du débit cardiaque et la vasoconstriction des territoires musculocutanée et splanchnique, permettant une redistribution du volume sanguin vers les territoires vitaux (Bonanno *et al.,* 2011 [01]).

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

2.1.2 La phase sympatho-inhibitrice

Lorsque la masse sanguine diminue au-delà de 30 à 50 %, se met en place la phase sympatho-inhibitrice. Elle survient lorsque les moyens mis en œuvre lors de la première phase ne sont plus suffisants pour maintenir une pression artérielle suffisante. Elle se caractérise par une bradycardie paradoxale et une chute brutale des résistances vasculaires systémique (RVS) responsables d'une chute de la PA (Kinsella *et al.*, 2001). La bradycardie est un phénomène indépendant suite à l'activation d'une boucle réflexe vago-vagale et sans effet sur la PA. Le mécanisme principal réside probablement en une inhibition centrale de l'activation sympathique liée, en partie, à la stimulation des récepteurs cardio-pulmonaires et de mécano-récepteurs ventriculaires. La bradycardie pourrait permettre un meilleur remplissage diastolique ventriculaire dans des conditions d'hypovolémie extrême, mais d'un autre côté supprime un mécanisme majeur de la régulation du débit cardiaque. Par ailleurs, cette phase hypotensive est caractérisée par une sécrétion hormonale importante essentiellement par l'activation de la sécrétion médullo-surrénalienne des catécholamines, et en particulier d'adrénaline. Le SRA est toujours activé avec une libération importante d'angiotensine II, de même la sécrétion de façon importante d'hormone anti-diurétique (ADH) et d'Arginine-Vasopressine qui est initialement provoquée par la diminution du volume sanguin et de la pression artérielle. Ces différentes hormones sont mises en jeu durant cette phase hypotensive afin de conserver l'action vasoconstrictrice et maintenir la perfusion des organes vitaux, puisque les mécanismes de régulation neuronaux sympathiques sont dépassés par la tachycardie.

3. La réponse inflammatoire et immunologique

Malgré l'efficacité de la réponse cardiovasculaire adaptative à la phase initiale du choc hémorragique, ce dernier s'il se prolonge, conduit à une défaillance hémodynamique et ainsi à un syndrome de défaillance multiviscérale (SDMV) avec l'apparition des lésions tissulaires secondaires à une réponse immunitaire et inflammatoire systémique non contrôlée et aggravé par le phénomène d'ischémie reperfusion tissulaire (Moore *et al*., 1995). Induite par le choc, cette réponse inflammatoire associée aux lésions tissulaires déclenchent un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS : *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) caractérisé par l'activation des protéines pro-inflammatoires telles que les cytokines (TNFα,

IFNα, IL1 IL6…), dont la production est corrélée avec la sévérité de l'état de choc (Boisson *et al.,* 1997), et par les polynucléaires neutrophiles qui sont activés principalement dans le poumon et le foie mais aussi dans de nombreux autres tissus (Bonanno *et al.,* 2011 [02]). L'augmentation des taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires est en rapport avec des lésions tissulaires directes essentiellement pulmonaires et hépatiques (Gonzalez *et al.,* 2001, Abraham *et al.,* 2000, Oreopoulos *et al.,* 2000). En réponse à l'activation du système pro-inflammatoire, l'organisme stimule également la sécrétion des protéines anti-inflammatoires. A ce stade du choc hémorragique traumatique, l'activation d'une réponse anti-inflammatoire, ou CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*), contrebalance les effets pro-inflammatoires. Ce déséquilibre est aussi induit par un excès de cytokines anti-inflammatoires suite à une immunosuppression (Abraham and Freitas 1989 ; Chaudry *et al*., 1990) associée à une augmentation de la susceptibilité aux infections (Stephan *et al.,* 1987).

D'autres facteurs responsables de l'évolution vers le syndrome de défaillance multi-viscérale est la sécrétion des radicaux libres oxygénés (Botha *et al*., 1995, Maier *et al.,* 2007, Fan *et al*., 2002, Molina *et al*., 2002, Pascual *et al*., 2003, Chen *et al*., 2003, Tamion *et al*., 2002, Schwartz *et al*., 1995). La génération des radicaux libres oxygénés débute très précocement suite à la baisse du transport en oxygène durant la phase d'ischémie (Fink *et al.,* 2002). Au cours de la phase de reperfusion, l'apport d'oxygène amplifie la production des radicaux libres générant un stress oxydant cellulaire (Abramov *et al.,* 2007). Ces radicaux libres ont une action dans l'initiation des voies de signalisations intracellulaires potentiellement toxiques (Xu, Zhao *et al.,* 2006) en altérant directement l'ADN et les protéines (Xu, Zhao *et al*., 2006) et induisant une toxicité directe sur la cellule par des réactions de peroxydations membranaires (altération du métabolisme oxydatif par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale) (Sharpe *et al*., 1998). La stimulation des voies de signalisations par les radicaux libres contribue en partie à la stimulation du système inflammatoire en augmentant la production des cytokines, des molécules d'adhésion leucocytaire et en activant l'adhésion plaquettaire à la surface de l'endothélium. L'endothélium est une cible privilégiée des lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) (Terada *et al.,* 2002) en vue de son positionnement à l'interface entre le sang circulant et les tissus. A l'état physiologique, l'endothélium participe à la régulation du tonus et à la perméabilité vasculaire et améliore ainsi la perfusion tissulaire. Il exerce également un rôle dans la coagulation en assurant l'équilibre pro/anti-coagulant au contact du sang. Les altérations des cellules endothéliales au cours de l'I/R entraînent une perte de ses propriétés anticoagulantes

suite à une adhésion des leucocytes sur le revêtement endothélial (Childs *et al.,* 2002, Roesner *et al.,* 2006). Ce phénomène est responsable d'une coagulation intravasculaire localisée au niveau veinulaire et participe à une altération directe de la microcirculation (Levi *et al*., 1999) par obstruction capillaire en réduisant le diamètre efficace de la microcirculation. La dysfonction endothéliale générée par l'I/R entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et expose l'endothélium à une fuite capillaire. Cette fuite aggrave l'hypoxie tissulaire par la formation d'œdème interstitiel.

4. Défaillance microcirculatoire

Au niveau microcirculatoire, au cours de la phase initiale du choc hémorragique, malgré des niveaux bas de pression artérielle, la densité des capillaires perfusés et la vitesse des globules rouges dans le réseau microvasculaire apparaissent bien préservées (Nakajima *et al.,* 2001). Toutefois, si cette phase initiale n'est pas rapidement contrôlée, une dégradation microcirculation avec ses conséquences d'oxygénation tissulaire apparaîtra. L'état de choc hémorragique peut entraîner une dysfonction d'organe dont le stade ultime est la défaillance multiviscérale. En effet, si les mécanismes cardiovasculaires adaptatifs sont efficaces à la phase aiguë du choc hémorragique et maintiennent une perfusion et des apports en oxygène adaptés aux besoins, ces derniers peuvent devenir insuffisants lors de la prolongation du choc avec l'apparition d'une souffrance tissulaire secondaire à l'inflammation systémique non contrôlée et aux phénomènes d'ischémie/reperfusion tissulaire.

Deux phénomènes principaux ont été décrits au niveau de la microcirculation : la faillite de la vasoconstriction sympathique (Bond *et al*., 1985) et les obstructions capillaires irréversibles (no-reflow phenomenon) (Kloner *et al.,* 1974, Barroso-Aranda *et al*., 1988). Plusieurs mécanismes conduisent à cette obstruction irréversible microcirculatoire : l'œdème des cellules endothéliales (Nakayama *et al.,* 1985) et l'adhésion des polynucléaires neutrophiles sur cet endothélium vasculaire (Laplace *et al.,* 2005).

4.1. La dysfonction endothéliale

L'endothélium est la première cible des phénomènes d'I/R. L'altération de ces cellules, secondaire à la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, provoque une perte de leurs propriétés structurelles (œdème endothélial, perméabilité augmentée) et fonctionnelles (réduction de la libération de NO, expression de molécules d'adhésion leucocytaires, activation de facteurs procoagulants). Il en résulte un œdème cellulaire et une fuite plasmatique du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel. La constitution de ces œdèmes peut provoquer une diminution de la lumière capillaire qui contribue à l'altération de la perfusion capillaire et ainsi à l'hypoxie tissulaire.

La lésion des cellules endothéliales provoque également une perte des propriétés anti-coagulantes de la barrière endothéliale. Ainsi, des phénomènes de coagulation intravasculaire peuvent participer à l'altération de la microcirculation.

4.2. La dysfonction vasculaire

Une caractéristique majeure du choc hémorragique est l'apparition rapide d'une dysfonction vasculaire caractérisée par une vasodilatation. Dès lors, le choc hémorragique ne répond plus au remplissage vasculaire et l'administration de vasopresseurs est nécessaire pour maintenir une pression de perfusion minimale (Salzman *et al.,* 1997). L'administration de noradrénaline restaure la pression artérielle, mais de façon temporaire traduisant une altération progressive de la réponse vasculaire aux vasopresseurs. Cette dysfonction vasculaire est associée à l'hypoxie cellulaire, l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants du muscle lisse vasculaire, l'acidose tissulaire, les cytokines pro-inflammatoires, la synthèse de NO (monoxyde d'azote) et la diminution des concentrations plasmatiques de vasopressine secondaire à un épuisement du stock au sein de la neurohypophyse. De ce fait, l'administration de vasopressine au cours du choc hémorragique non contrôlé permet expérimentalement de restaurer les paramètres hémodynamiques (Morales *et al.,* 1999, Stadlbauer *et al.,* 2003).

4.3. La dysfonction hémostatique

L'hémorragie induit une diminution des facteurs de la coagulation et des plaquettes accompagnée de stigmates biologiques témoins d'une activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Les principales causes de la coagulopathie observées lors du choc hémorragique sont l'activation de la fibrinolyse, l'hypothermie, la baisse de l'hématocrite, la transfusion massive, l'acidose et les désordres hydroélectrolytiques majeurs (Lynn *et al.,* 2002). La fibrinolyse est activée par la libération de quantité importante de facteur tissulaire, de thromboplastine, et d'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). L'hypothermie ralentit les réactions enzymatiques de la cascade de la coagulation, réduit la synthèse de facteurs de coagulation, augmente la fibrinolyse, et diminue le décompte et la fonction plaquettaire. Ces anomalies sont cliniquement significatives dès 35°C. La perfusion d'un volume important de cristalloïdes et de colloïdes peut induire une coagulopathie de dilution. Le fibrinogène est le facteur dont la concentration plasmatique chute le plus précocement. Les modifications de concentrations des autres facteurs de la coagulation sont beaucoup plus variables et imprévisibles. La baisse de l'hématocrite induit également des troubles de l'hémostase puisque les globules rouges participent à l'activation de l'agrégation plaquettaire.

Lorsque l'hypovolémie devient trop importante, les troubles microcirculatoires au niveau glomérulaire provoquent une vasoconstriction de l'artériole afférente au détriment de l'artériole efférente, entraînant une chute du débit de filtration glomérulaire (Legrand *et al.,* 2010). De plus, la réabsorption tubulaire est insuffisante et ne permet pas d'améliorer la volémie. En clinique, ces phénomènes provoquent une insuffisance rénale aiguë qualifiée de fonctionnelle, car rapidement régressive après restauration d'une hémodynamique correcte.

III. CAS PARTICULIERS : LA CIRRHOSE

1. Définition et Epidémiologie

La cirrhose a été définie par l'OMS en 1977 comme une fibrose mutilante, caractérisée par une transformation de l'architecture normale du foie conduisant à des nodules de structure anormale (nodules de régénération hépatocytaire). En France, la prévalence de la cirrhose environ de 1500 à 2500 cas par million d'habitants, le nombre de décès est environ à 15000 décès par an (Hélène 2006). Son évolution peut être divisée en deux périodes : une période où elle est non compliquée (ou asymptomatique ou compensée) et une période où elle se complique.

Selon l'étiologie, on peut distinguer plusieurs formes de cirrhose (Balian 2005):

- **La cirrhose alcoolique** présente des aspects variés, fonction de l'évolution et de l'importance de l'intoxication alcoolique, et d'éventuels phénomènes inflammatoires vasculaires ou généraux surajoutés.
- **La cirrhose post-hépatique virale** est souvent de type macronodulaire. Il peut persister une partie des connexions entre les nodules et leurs axes vasculaires. La fibrose est irrégulière et peut être assez inflammatoire, en rapport avec une infiltration lymphocytaire.
- **La cirrhose post-hémochromatosique génétique** causée par une anomalie congénitale et héréditaire du métabolisme du fer responsable d'une augmentation de la concentration du fer intra-hépatique.
- La **cirrhose biliaire primitive** est une hépatopathie auto-immune chronique qui affecte avec une grande fréquence les femmes (90%). Le diagnostic repose sur la présence d'anticorps anti-mitochondries, une augmentation des IgM et sur l'histologie hépatique qui permet de distinguer 4 stades de gravité croissante.
- **La cirrhose biliaire secondaire** dérive d'une cholestase extra-hépatique majeure secondaire à une cirrhose du foie. Elle est associée à une large fibrose portale parfois oedémateuse, soutenant une prolifération cholangiolaire marquée et un infiltrat inflammatoire à polynucléaires neutrophiles.

2. Etiologie et facteurs de risque

Une agression hépatobilaire et/ou une inflammation peuvent conduire à une fibrose hépatique et déclencher un désordre hémodynamique et splanchnique majeur aboutissant à plusieurs maladies cardio-vasculaires. Le taux de progression de la fibrose dépend de plusieurs facteurs de risque qui diffèrent selon l'étiologie et qui déterminent la sévérité de l'inflammation et de l'agression hépatique (Poynard *et al*., 1997). En France, les principales causes des maladies du foie sont l'intoxication alcoolique, les hépatites virales chroniques B et C, les *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) et l'hémochromatose génétique (Sawadogo *et al.,* 2007). La consommation excessive d'alcool est le facteur prédominant dans la progression de la fibrose hépatique avant l'hyperglycémie et l'obésité. Par contre, les facteurs de risque de progression de la fibrose hépatique dans le cas de l'hépatite C sont multiples et on trouve principalement ; l'âge, une co-infection virale B, une immunosuppression, le sexe masculin, une surcharge ferrique (Friedman *et al.,* 2003). Les facteurs de risques associés à la progression de la fibrose hépatique suite à un NAFLD sont le diabète de type 2, l'hyperglycémie, l'âge et l'obésité (Farrell *et al.,* 2006).

L'état de fibrose hépatique peut s'aggraver pour donner naissance à une cirrhose du foie. La certitude de l'évolution d'une fibrose hépatique à une cirrhose chez un patient est difficile à évaluer. Néanmoins, la progression vers la cirrhose intervient dans un délai de 15 à 20 ans chez la majorité des patients (Bataller *et al*., 2005).

3. Modifications histologiques : Fibrose hépatique

3.1. Amplification de la matrice extracellulaire

Bien que les causes d'une agression chronique du foie soient multiples, le comportement du tissu hépatique en cas de lésion est semblable quelle que soit leur cause. Le tissu hépatique normal est constitué par les hépatocytes et les cellules biliaires au niveau épithélial et au niveau endothélial, les cellules endothéliales constituent la sinusoïde hépatique associées aux cellules de Kuppfer (macrophages tissulaires) (cf. Figure 11). L'espace entre les hépatocytes et les cellules endothéliales, appelé espace de Disse ou périsinusoïdal, contient également les cellules étoilées ou cellules de Ito (cellules périvasculaires mésenchymateuses)

et la matrice extracellulaire (MEC) (cf. Figure 11). La MEC provient de l'assemblage de plusieurs macromolécules appartenant à différents familles :

- Les collagènes fibrillaires I et III sont responsables de la résistance et l'étirement, ils représentent respectivement 60 et 30% des collagènes vasculaires (Jacob, 2003). Le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des collagènes conduit à des anomalies qualitatives et/ou quantitatives qui se traduisent par des modifications histologiques et structurales des tissus comme dans le cas d'une fibrose hépatique. D'autres collagènes existent sous forme non fibrillaire (IV, VIII) et s'associent en réseaux pour assurer l'élasticité du tissu ou pour participer à la formation des lames basales (Van der Rest, 1991).
- Les glycoprotéines de structure, principalement la fibronectine et la laminine.
- Les lames élastiques sont formées par l'assemblage des molécules d'élastines très hydrophobes et qui ont la propriété élastique (Foster *et al*., 1990). Les élastases sont les protéases spécifiques pour la dégradation de l'élastine. Egalement, on trouve certaines métalloprotéases (MMP) matricielles responsable de la dégradation de l'élastine ; la matrilysine (Murphy *et al.,* 1991), la gélatinase A et B (Murphy *et al.,* 1991 ; Senior *et al.,* 1991) et la métalloélastase.
- Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules formées par des longues chaînes polysaccharidiques, dénommées glycosaminoglycanes (GAGs), liées de façon covalente à une protéine centrale. Les PGs sont dégradés par un certain nombre de protéases incluant la stromélysine, la matrilysine, les gélatines A et B, la plasmine, les cathepsines et les élastases (Birkedal-Hansen *et al*., 1993, Werb 1989).
- les glycosaminoglycanes (acide hyaluronique).

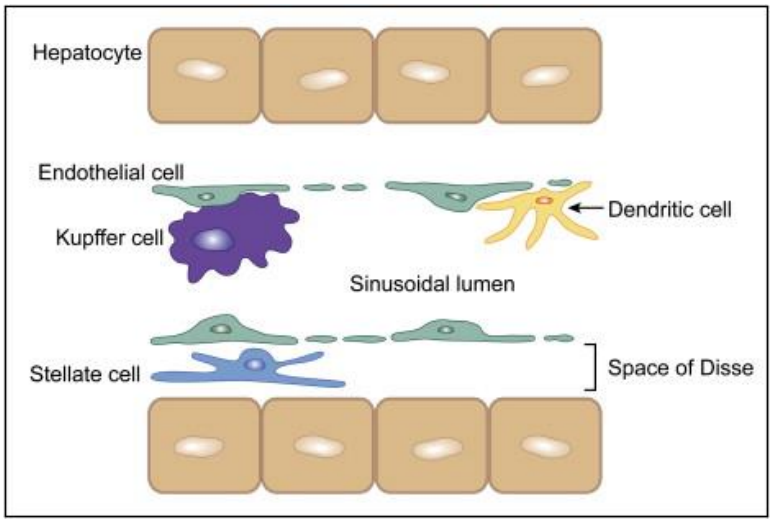


Figure 11: Les cellules de la sinusoïde hépatique.
(Unanue *et al.*, 2007)

Les cellules de Ito ou étoilées sont situés dans l'espace de Disse, qui est séparée de la lumière par l'endothélium fenestré. Les cellules de Kupffer face à la lumière

La MEC est une composante qui fait fonction de membrane basale et joue un rôle important dans le fonctionnement du tissu hépatique. Le rôle de la MEC comprend différents mécanismes qui sont impliqués dans la communication intercellulaire, l'adhésion des cellules, leur migration, leur différentiation, leur croissance et la régulation de leurs gènes. Une modification qualitative et quantitative de la composition de cette MEC entraîne un désordre tissulaire et conduit à une fibrose hépatique. En réponse à une agression hépatique excessive, la fibrogenèse dépasse la fibrolyse et provoque un déséquilibre entre la synthèse, le dépôt et la dégradation des constituants de la MEC. Ce déséquilibre produit une augmentation des constituants de la MEC et aboutit à une désorganisation de l'architecture hépatique à la fois sur le plan anatomique et fonctionnel pour conduire, à la fin, à une fibrose pathologique. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) constituent une famille d'endopeptidases calcium et zinc-dépendantes, capable de dégrader les différents composants de la MEC et des lames basales. Dans le tissu hépatique, les MMP sont synthétisées et sécrétées principalement par les cellules périvasculaires mésenchymateuses (Parks *et al.*, 2001). Un équilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) maintient le remodelage de la MEC. Suite à une hépatopathie chronique chez l'homme, les cellules étoilées du foie diminuent la synthèse des métalloprotéinases et des collagénases associées à un défaut de leurs activations provoquées par les TIMP. Il en résulte une diminution de la dégradation du collagène interstitiel.

Plusieurs protéines jouent un rôle important dans la modification de la MEC. Principalement, on trouve le collagène qui, suite à l'activation des cellules étoilées, devient de type IV et VI dans la fibrose (il est de type I et III dans la MEC normale). Au cours de ce processus, la quantité totale de collagène se multiplie 3 à 10 fois induisant une modification et une augmentation globale de la MEC par la formation des fibrilles. En réponse à une atteinte toxique, les cellules endothéliales produisent la fibronectine, qui est une protéine de surface responsable de l'attachement des fibrilles de collagène aux hépatocytes. En plus, les cellules étoilées, à coté des cellules endothéliales, produisent la lamine qui est une glycoprotéine intervenant dans la formation d'une membrane basale autour des hépatocytes atteints. En plus de l'épaississement de la MEC, l'endothélium perd ses fenestrations, suite à un changement phénotypique des cellules endothéliales, ce qui aboutit à une diminution des échanges entre le sang et les hépatocytes.

3.2. Activation des cellules étoilées

Le rôle physiologique des cellules étoilées est de stocker la vitamine A. Elles contribuent aussi au phénomène de fibrogenèse hépatique dans les états pathologiques. La fibrogenèse hépatique est un processus dynamique avec une balance entre la synthèse de collagène et des autres composants, et la dégradation de la MEC. Les lésions hépatocytaires permettraient l'activation des cellules de Kupffer et des cellules biliaires et la libération des cytokines et des facteurs de croissance qui vont provoquer l'activation des cellules étoilées et induire leur prolifération et leur transformation en myofibroblastes contractiles (Friedman 2003).

Les cellules étoilées activées prolifèrent et produisent du collagène fibrillaire et des enzymes protéolytiques (Bataller *et al*., 2005). Cette activation a lieu en deux phases :

- La phase d'initiation englobe les changements induits dans l'expression génique et phénotypique qui rendent les cellules réceptrices aux stimuli des cytokines et autres facteurs (Friedman 2003). Les cytokines et le *transforming-growth factor b* (TGF-b) libérés par les cellules de Kupffer activées induisent la transformation et la prolifération de cellules étoilées activées.

- La phase de perpétuation ; englobe les événements résultant d'une stimulation autocrine et paracrine, qui amplifient l'activation phénotypique par une augmentation de

l'expression de facteurs de croissance et de la réponse à ces facteurs (Friedman 2003). Cette phase consiste en une prolifération des cellules étoilées activées qui est principalement due à la stimulation par le *Platelet-derived growth factor* (PDGF) sécrété par les plaquettes (cf. Figure 12).

Les cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-6), libérées par les leucocytes recrutés dans le foie lors de phénomènes inflammatoires, dirigent par chémotactisme les cellules étoilées vers les zones d'inflammation active. Les myofibroblastes expriment un phénotype de cellules contractiles contenant l'alpha-actine qui est un phénomène majeur à l'origine de l'augmentation de la pression portale

Les cellules étoilées sont une source importante des MMP qui dégradent le collagène de type IV, que l'on trouve dans la MEC normale, ainsi que d'inhibiteurs de MMP provoquant finalement la déposition d'un tissu fibrotique pathologique.

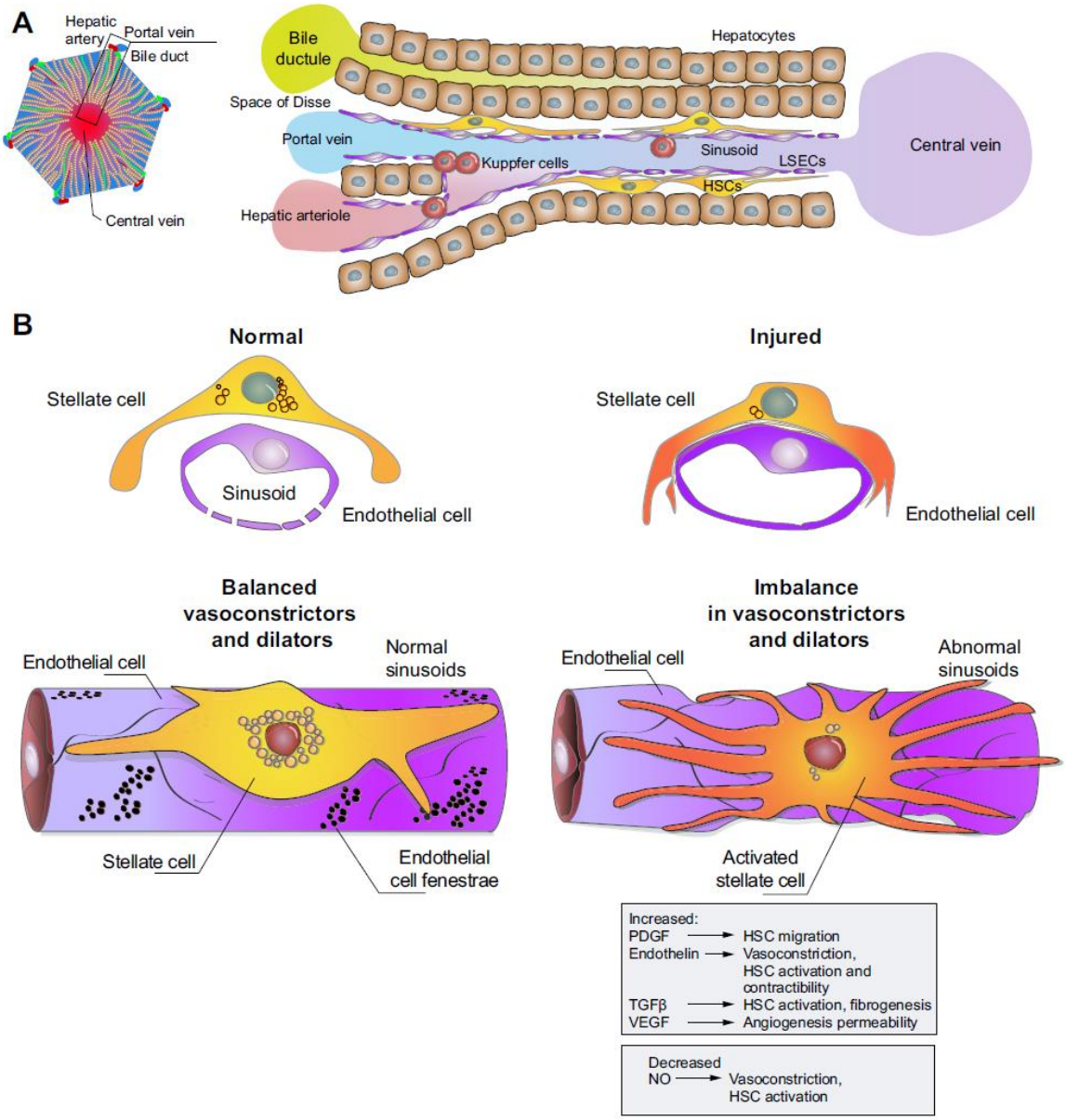


Figure 12: Activation des cellules étoilées en réponse d'une agression hépatique.
(Iwakiri et al., 2014)

(A) représente une version simplifiée d'un tissu portail (à gauche), la veine centrale (à droite), et les différents types cellulaires du sinusoïde hépatique. **(B)** montre la sinusoïde en réponse à une lésion hépatique ; le panneau supérieur montre une image en coupe transversale, tandis que le panneau du bas montre une vue en 3 dimensions. A l'état normal (à gauche), les cellules endothéliales sinusoïdales produisent NO pour maintenir un état de faible résistance. En réponse à une lésion du foie, des changements importants se produisent dans la sinusoïde. Des lésions hépatiques (à droite) conduit à des anomalies morphologiques et moléculaires dans les cellules endotheliales sinusoïdales et les cellules étoilées. Par exemple, les cellules endothéliales en perdant leurs fenestrations, développent un défaut dans la production de NO, et en même temps d'augmenter la production d'autres protéines telles que la fibronectine et de l'endothéline qui peuvent contribuer à l'activation des cellules étoilées. Lors de leur activation, les cellules étoilées développent un phénotype contractile accrue et induit la multiplication de la matrice extracellulaire. Un certain nombre des interactions paracrine et autocrine se produisent entre les cellules endothéliales sinusoïdales et cellules étoilées avec la production des certaines des molécules (boîte grise). HSC : hepatic stellate cells; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell.

3.3. Complications de la fibrose hépatique

Le processus de fibrogenèse, par accumulation de collagène aboutit à une condensation et multiplication de la MEC et favorise une distorsion architecturale et fonctionnelle favorisés par la formation des nodules de régénération (Shibayama *et al.,* 1985). La condensation de la MEC et la perte de fenestration des cellules endothéliales entraînent une rigidification des sinusoïdes (Rockey *et al.,* 1993) et un dépôt de collagène dans l'espace de Disse (Orrego *et al*., 1979). Ces modifications anatomiques réduisent les échanges entre le sang et les hépatocytes ce qui entraîne une augmentation des résistances intrahépatiques. Ainsi, le développement excessif de la fibrose a pour conséquences :

- une diminution de la perméabilité sinusoïdale
- une diminution de la perfusion hépatocytaire due au développement d'une circulation collatérale
- une hypertension portale (HTP) par augmentation des résistances intrahépatiques.

4. Modifications splanchniques : Hypertension Portale

Au cours de la cirrhose, l'HTP résulte de la combinaison d'une augmentation des résistances intra hépatiques et du débit sanguin portal.

4.1. L'augmentation des résistances intra hépatiques

L'augmentation des résistances intra-hépatiques est le résultat de deux composantes :

- <u>Composante mécanique</u> dépend du remaniement de l'architecture hépatique et du développement de la fibrose. Le processus de fibrogenèse aboutit à la condensation de la MEC, la perte de fenestrations des cellules endothéliales et un dépôt de collagène dans l'espace de Disse (Orrego *et al*., 1979) entraînant la diminution du volume sinusoïdal, sa regidification et sa capillarisation (Rockey *et al*., 1993). Ces modifications anatomiques réduisent les échanges entre le sang et les hépatocytes ce qui entraîne une augmentation des résistances intrahépatiques.

- Composante dynamique due à des phénomènes vasoactifs. La microcirculation intra-hépatique est altérée de façon significative dans la cirrhose, secondaire à des modifications d'architecture (déclenchés par des phénomènes humoraux) et des phénomènes vasoactifs. Ces deux mécanismes entraînent une augmentation de la sécrétion des molécules vaso-actives, telles que l'angiotensine II, l'endothéline 1, et cysteinylleukotrienes associés à une diminution de la production de NO intra-hépatique par les cellules endothéliales (cf. Figure 13). (Gupta *et al*., 1998, Shah *et al*., 1999), Le déficit de NO est due à une diminution de l'activité de monoxyde d'azote synthase (NOS), et une hyperproduction d'endothéline (un peptide vasoconstricteur) (Pinzani *et al.*, 1996).

Les myofibroblastes, situées dans les sinusoïdes, expriment des récepteurs membranaires aux vasoconstricteurs et aux vasodilatateurs. Ces cellules contractiles, à côté des cellules musculaires lisses vasculaires, se contractent en réponse à un déséquilibre entre les substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Ceci favorise une vasoconstriction secondaire des vaisseaux intra-hépatiques en contribuant à majorer les résistances intra-hépatiques et donc la pression porte.

La diminution de l'activité de la NOS endothéliale (NOSe) pourrait être expliquée par l'interaction des différentes mécanismes. L'hyper-expression de la cavéoline au cours de la cirrhose inhibe la phosphorylation de NOSe et ainsi l'activation de L-arginine par l'augmentation des liaisons cavéoline-NOSe (Shah *et al*., 1999). Un autre facteur, l'inhibition de la phosphorylation de la protéine kinase B (Akt), induit l'inactivité de la NOSe, par l'hyper-expression de la kinase couplée aux récepteurs de la protéine G (*G-protein-coupled receptor kinase-2* [GRK2]) dans les cellules endothéliales des foies cirrhotiques (Liu *et al*., 2005). Un troisième facteur, l'hyper-production de la diméthylargine (ADMA), un inhibiteur endogène de NOS, diminue l'activité de NOSe en interagissant avec la L-arginine (Laleman *et al*., 2005).

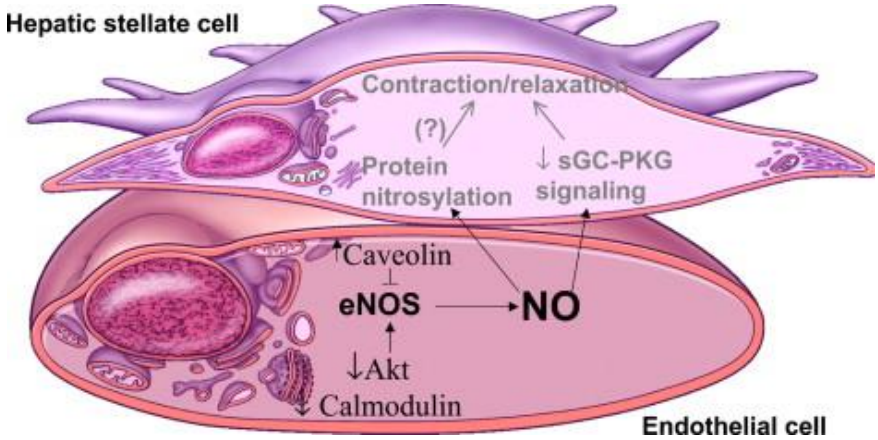


Figure 13: Vasoconstriction intrahépatique par diminution de NO
(Langer et al., 2005)

La signalisation du NO intrahépatique est altérée au cours de l'hypertension portale. La biodisponibilité du NO est diminuée dans les sinusoïdes du foie. La production de NO par les cellules endothéliales sinusoïdales est diminuée par plusieurs mécanismes. Le taux de eNOS est inchangés, mais l'activité est inhibée en raison de l'interaction avec la cavéoline, une diminution de la phosphorylation de Akt et diminution de la liaison de la calmoduline. En outre les HSC subissent une réponse de relaxation à NO qui peut être, en partie, due à une diminution de la voie de signalisation de GMPc et de protéines nitrosation. eNOS, endothelial nitric oxide synthase; sGC, soluble guanylate cyclase; PKG, protein kinase G.

4.2. L'augmentation du débit sanguin portal

L'augmentation du débit sanguin dans le territoire porte dépend en partie du débit dans la circulation collatérale porto-cave. Les vaisseaux collatéraux porto-systémiques, ou shunts, sont des vaisseaux anormaux qui permettent au sang de court circuiter le foie. Le sang n'est donc plus filtré par le foie. Ces veines sont développées à partir du processus d'angiogenèse (Iwakiri *et al*., 2014) dans une réponse à l'augmentation de la pression porte. Le changement de la pression porte est ressenti, dans un premier ordre, par la microcirculation intestinale ensuite par les artères de la circulation splanchnique (Abraldes *et al.*, 2006). Ces vaisseaux en réponse, produisent différents facteurs angiogeniques, principalement VEGF (Huang *et al*., 2012, Geerts *et al.*, 2006) et *placenta growth factor* (PIGF) (Van Steenkiste *et al.*, 2009), qui stimulent l'angiogenèse et favorisent la formation du shunt porto-systémique.

Le but de la circulation portocave est la décompression du système veineux splénique, mésentérique supérieur et portal, conséquence de l'hypertension portale, en créant une communication entre un circuit à basse résistance : le système veineux hépatique, et un système à haute résistance : le système porte. Cependant, la pression portale reste élevée à cause de l'augmentation du débit sanguin splanchnique conséquence de la vasodilatation

splanchnique. Les anastomoses portocaves sont de plus responsables des principales complications de la cirrhose. Elles sont la cause directe de l'hémorragie par rupture de varices œsophagiennes ou gastriques et elles contribuent au développement de l'ascite, de l'encéphalopathie hépatique et des complications pleuropulmonaires (Iwakiri *et al.,* 2006).

5. Modifications systémiques : hypercinésie circulatoire

La circulation porto-systémique pourrait être indirectement responsable de l'hypercinésie circulatoire, associé à une vasodilatation artérielle splanchnique et systémique, par une surproduction de NO (cf. Figure 14). En effet, l'élévation de la pression dans la veine porte induit une augmentation du retour veineux sanguin par les anastomoses portocaves et favorise l'augmentation du débit cardiaque. La force de cisaillement résultante stimule la production de NO par le NOSe. De plus, l'endotoxémie provoque la production de plusieurs cytokines, comme TNF-α, en réagissant au transfert des endotoxines à travers la membrane intestinale dans la circulation systémique (Bode *et al*., 1987, García-Tsao *et al.,* 2001). Ceci est considéré comme lié à l'altération de la perméabilité de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de cirrhose, d'où le transfert des endotoxines différentes à travers la membrane intestinale dans la circulation systémique. Les cytokines libérées participent à la production de NO par le NOS inductible (Odeh *et al.,* 2004, Lopez-Talavera *et al*., 1996). La surproduction de NO dans la circulation systémique conduit à une vasodilatation systémique et splanchnique majorée.

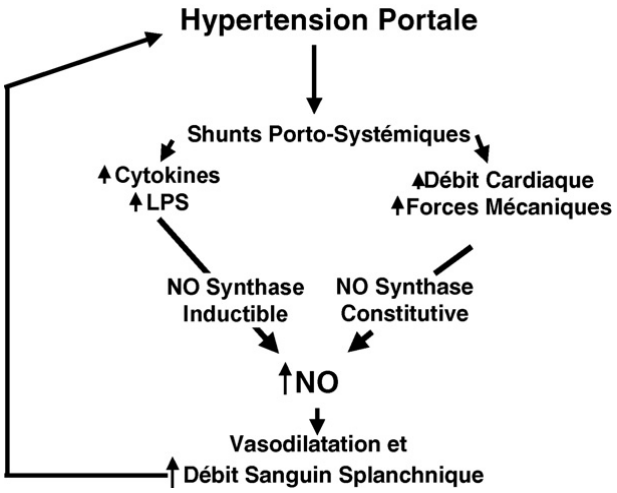


Figure 14: Rôle de la circulation porto-systémique dans la vasodilatation splanchnique
(Lebrec *et al.,* 2009).

La production de NO par le NOSe dans la circulation systémique est en partie liée à l'activation du système rénine angiotensine (SRA). L'angiotensine II est un vasoconstricteur produit par l'action enzymatique de *Angiotensin-converting enzym* (ACE). L'Ang II est clivée par ACE2 pour générer un peptide actif : Ang (1-7). Ang (1-7) est un vasodilatateur qui se lie à la *G-protein coupled recepter Mas* (MasR) (Santos *et al*., 2003) et induit l'activation de NOSe et la production de NO par les cellules endothéliales (Heitsch *et al.*, 2001).

La surproduction de NO dans la circulation systémique est associée à des effets hémodynamiques marqués. Ces changements consistent en une résistance vasculaire systémique diminuée, une chute de la pression artérielle systémique et, enfin, une augmentation de l'index cardiaque (Henriksen *et al*., 2009, Moller *et al*., 2001). Cette chute des résistances vasculaires conduit à une situation d'hypotension et une hypovolémie effective, les récepteurs volémiques vont ainsi être stimulés. L'existence de cette vasodilatation entraîne une redistribution anormale des volumes sanguins, une réduction du volume sanguin central avec une suractivation des systèmes Rénine-Angiotensine-Aldostérone et du Système Nerveux Sympathique (RAA et SNS). Ceci joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'ascite et dans le dysfonctionnement rénal lors de maladies chroniques du foie. Cette vasodilatation participe aussi à l'augmentation du débit sanguin systémique et splanchnique, lui-même responsable d'une augmentation de l'hypertension portale (cf. Figure 15). Les modifications hémodynamiques hépatiques, splanchniques et systémiques chez les patients souffrant de cirrhose avancées sont résumées dans le Tableau 2.

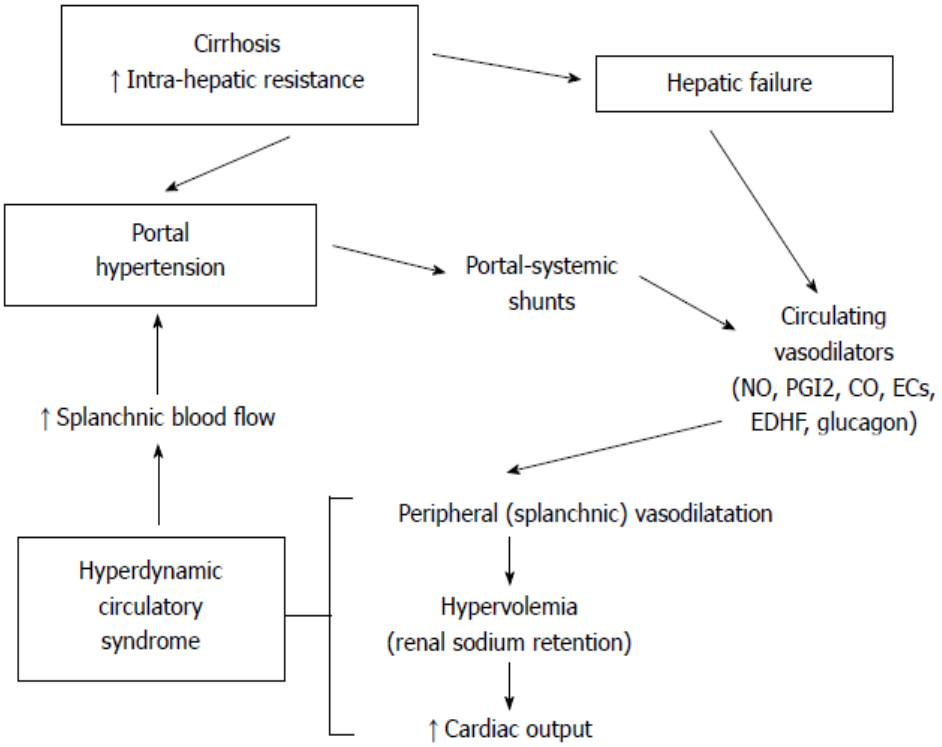


Figure 15: Schéma de la relation entre la vasodilatation splanchnique, le syndrome d'hypercinésie circulatoire, et l'hypertension portale dans la cirrhose hépatique.
(Bolognesi *et al.*, 2014)

NO: Nitric oxide; PGI2: Prostacyclin; CO: Carbon monoxide; ECs: Endogenous cannabinoids; EDHF: Endothelium derived hyperpolarizing factor.

Les dérivés de la vasopressine (terlipressine [TP]) et la noradrénaline (NE) sont les seuls traitements pharmacologiques dont l'efficacité soit démontrée au cours du syndrome hépatorénal. Dans 50% des cas, les malades ont une réponse objective à la terlipressine avec une augmentation de la diurèse et une diminution de la créatininémie. Toutefois, dans la majorité des cas, l'effet bénéfique de la terlipressine est essentiellement transitoire. La transplantation hépatique est le seul traitement durable efficace.

Circulation hépatique
Resistance architecturale accrue Dysfonction endothéliale
Circulation splanchnique
Pression augmentée dans le territoire veineux porte Vasodilatation artérielle splanchnique Débit veineux porte augmenté Formation de collatérales veineuses porto-systémiques
Circulation systémique
Réduction du volume effectif artériel Augmentation du débit cardiaque, ouverture de shunt artério-veineux Réduction des résistances systémiques et pression artérielle réduite Hyperactivité des systèmes RAA et SNS

Tableau 2: Modifications hémodynamiques hépatiques, splanchniques et systémiques chez le patient cirrhotique

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail est l'étude des conséquences hémodynamiques *in vivo* et *ex vivo* des trois cas de dysfonction vasculaire ; choc septique, choc hémorragique et cirrhose aux niveaux systémique, splanchnique et de l'organe, ainsi que les effets des molécules vasoactives (H_2S, TP et NE) dans ces situations pathologiques sur l'hémodynamique, les réponses inflammatoires, la fonction rénale et la réactivité vasculaire dans des modèles expérimentaux de choc induisant une ischémie/reperfusion et de cirrhose induisant une hypertension portale.

Ce travail s'inscrit dans la suite des études réalisées dans le laboratoire et vise plus particulièrement à préciser les mécanismes mis en jeu sur le plan hémodynamique. Au cours de ces trois années, j'ai participé à la mise au point de différents modèles expérimentaux *in vivo* (tels que le choc hémorragique, le choc septique, l'ischémie/reperfusion d'organes et la cirrhose) pour parfaire mes connaissances sur cette approche thérapeutique et mécanistique. L'exploration de la réactivité vasculaire *in vivo* repose sur les techniques hémodynamiques standards (pression artérielle moyenne, fréquence cardiaque, débit cardiaque et débits régionaux) alors que l'évolution microcirculatoire est mesurée par vidéomicroscopie par lumière polarisée (technique SDF - *Sidestream Dark Field*). L'exploration de la réponse inflammatoire est réalisée par technique d'immunohistochimie (IHC) et la réactivité vasculaire *in vitro* est mesurée par la technique de myographie.

Dans une première partie (Etude 1), nous avons évalué les perturbations hémodynamiques rénales aux niveaux macro- et microcirculatoire au cours d'un modèle expérimental de choc septique dans le but de :

- Décrire les variations hémodynamiques dans les territoires capillaires péritubulaires lors des variations de pression dans l'artère rénale.
- Evaluer les effets thérapeutiques de la noradrénaline (NE) dans le même modèle.

Dans une deuxième partie (Etude 2), nous avons choisi, dans la poursuite des études précédentes effectuées dans notre laboratoire, d'évaluer l'effet de NaHS, donneur de H_2S, et de PAG, inhibiteur endogène de H_2S, sur la fonction et l'hémodynamique rénale en reprenant le

modèle de choc hémorragique mis au point au laboratoire. Pour s'approcher des recommandations européennes de prise en charge des états de choc hémorragique, nous avons contrôlé notre modèle expérimental par un remplissage vasculaire. Notre analyse a été centrée plus précisément sur l'exploration de la fonction rénale ainsi que sur la macro- et la microcirculation rénale puisque nous disposons de la technique SDF. Ce modèle a été adapté afin d'évaluer l'effet d'H_2S sur la fonction rénale en s'affranchissant de l'effet hémodynamique propre, puisque les animaux ont tous été réanimés avec un objectif de PAM similaire.

La dernière partie de ce travail (Etude 3) vise à comparer les effets vasoconstricteurs de la terlipressine et de la noradrénaline sur l'hypertension portale induite par une cirrhose biliaire secondaire chez le rat dans un modèle expérimental par section du canal cholédoque (BDL). Dans cette partie, nous avons étudié les effets de ces deux molécules sur les perturbations hémodynamiques systémique et splanchnique *in vivo* ainsi que sur la réactivité vasculaire *in vitro* avant et après la cirrhose.

Ces travaux ont donné suite à des publications (acceptées, soumises et en cours de soumission) dans des revues scientifiques.

ETUDE 1 :

Etude de l'hémodynamique et de l'autorégulation rénale dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat. Influence du sepsis.

1. FONCTION RENALE ET CHOC SEPTIQUE

1.1. Anatomie générale du rein

Les reins sont deux organes rétro-péritonéaux et para-vertébraux, représentant 0,5 % du poids corporel. Ils reçoivent à eux seuls 20 à 25 % du débit cardiaque et utilisent 10 % de la consommation d'oxygène (VO_2) totale de l'organisme (Leblanc *et al.* 1997). Toutes ces caractéristiques reflètent l'importance en terme de métabolisme des reins. Macroscopiquement, se distinguent dans le rein deux zones concentriques : une zone superficielle appelée cortex ou zone glomérulaire, qui contient jusqu'à un million de glomérules par rein, plus en profondeur on observe la zone médullaire, constituée des pyramides de Malpighi. Ces dernières sont formées par une multitude de tubes collecteurs qui s'ouvrent sur le bassinet, zone où est collectée l'urine. Cet aspect anatomique est le résultat d'une disposition différente des segments néphroniques entre ces différentes couches. Le néphron est l'unité fonctionnelle excrétrice du rein (cf. Figure 16). Il est responsable de la filtration du sang et de sa purification. Chaque néphron est constitué d'un glomérule et d'un tubule rénal (Gougoux *et al.* 2005). La formation de l'urine se fait par des étapes successives au sein de cette unité fonctionnelle présente près d'un million de fois au niveau du rein. Le glomérule de Malpighi est délimité par la capsule de Bowman et assure la filtration plasmatique à l'origine de l'urine primitive (cf. Figure 17). Il assure la réabsorption de 75% de l'eau et des électrolytes issus de l'ultrafiltrat glomérulaire. La partie droite du tube proximal plonge dans la médullaire et se poursuit par l'anse de Henlé, dont la principale fonction est la concentration des urines. L'anse de Henlé possède toujours un segment grêle descendant et un segment large ascendant qui remonte dans le cortex. Cette portion du tube effectue une boucle dans la médullaire et reprend un trajet ascendant pour donner naissance au tube contourné distal qui va rejoindre le tube collecteur (Mimura *et al.* 2010). Ce système est à l'origine des échanges ioniques et de molécules entre l'interstitium et le secteur urinaire permettant la formation de l'urine définitive.

De part son rôle important dans la filtration sanguine le rein possède un système vasculaire complexe. La vascularisation rénale (Martin *et al.* 2006) est assurée par les deux artères rénales qui naissent de l'aorte abdominale, en dessous de l'artère mésentérique supérieure et du tronc cœliaque. Au niveau des néphrons externes, les systèmes

microcirculatoires glomérulaires et tubulaires (tubes contournés proximaux et distaux) sont situés dans le cortex, la zone la plus superficielle (Ichai *et al.* 2005). Ce système microcirculatoire débute par l'artériole afférente qui pénètre dans la capsule de Bowman où elle se ramifie pour donner le glomérule. La microcirculation rénale continue par l'artère efférente post-glomérulaire qui est suivie par un capillaire péri-tubulaire entourant les tubes contournés distal et proximal (Martin *et al.* 2006), lieu d'échange des solutés, de l'O_2 et d'eau entre tubule et capillaire (Brezis *et al.*1994). Cette situation unique rencontrée en physiologie reflète le lien étroit entre la microcirculation tubulaire qui est la continuité de la microcirculation glomérulaire pour former tout un réseau microcirculatoire. Toute perturbation induite au niveau microcirculatoire, suite à des situations pathologiques qui altèrent la physiologie rénale, a des conséquences néfastes sur l'équilibre hémodynamique. Ainsi une perturbation au niveau de l'artériole afférente ou efférente est susceptible d'avoir des conséquences sur la microcirculation péritubulaire qui se comporte alors comme une "victime".

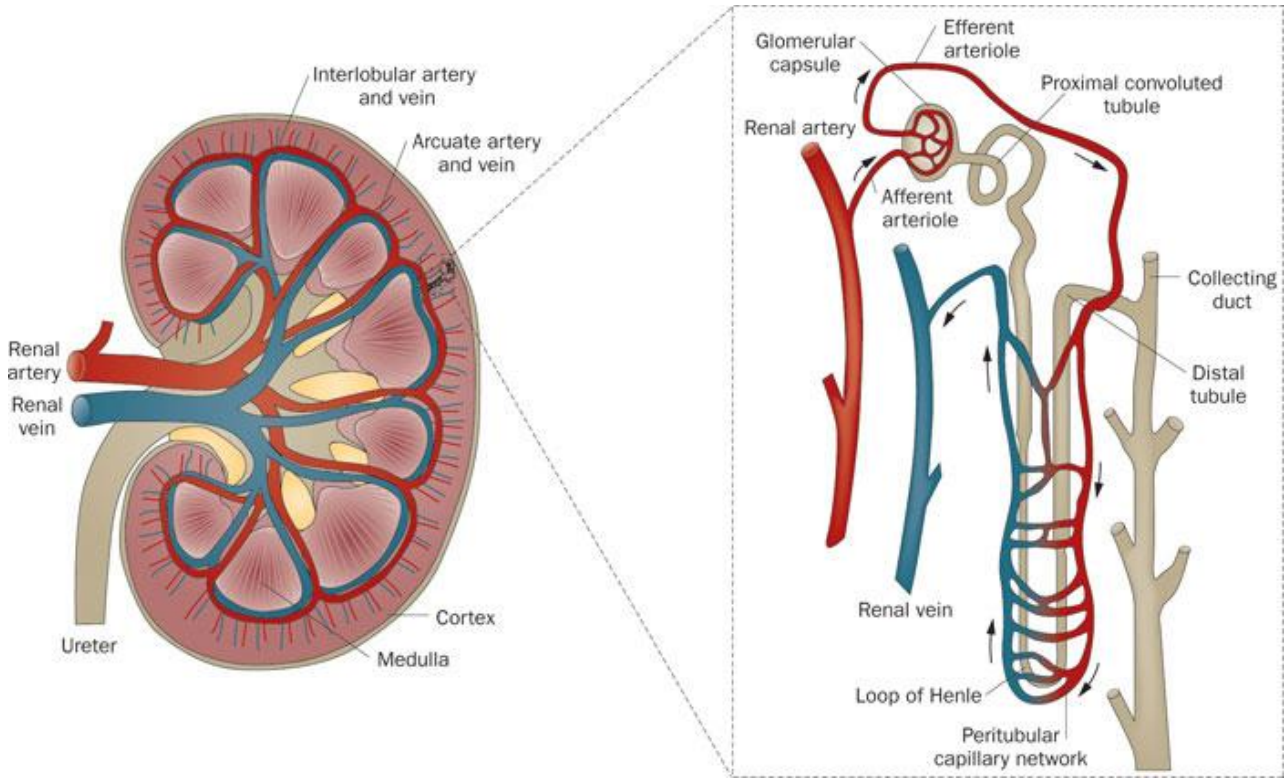


Figure 16: Anatomie du rein, disposition des néphrons et organisation de la vascularisation rénale
(Mimura et al., 2010)

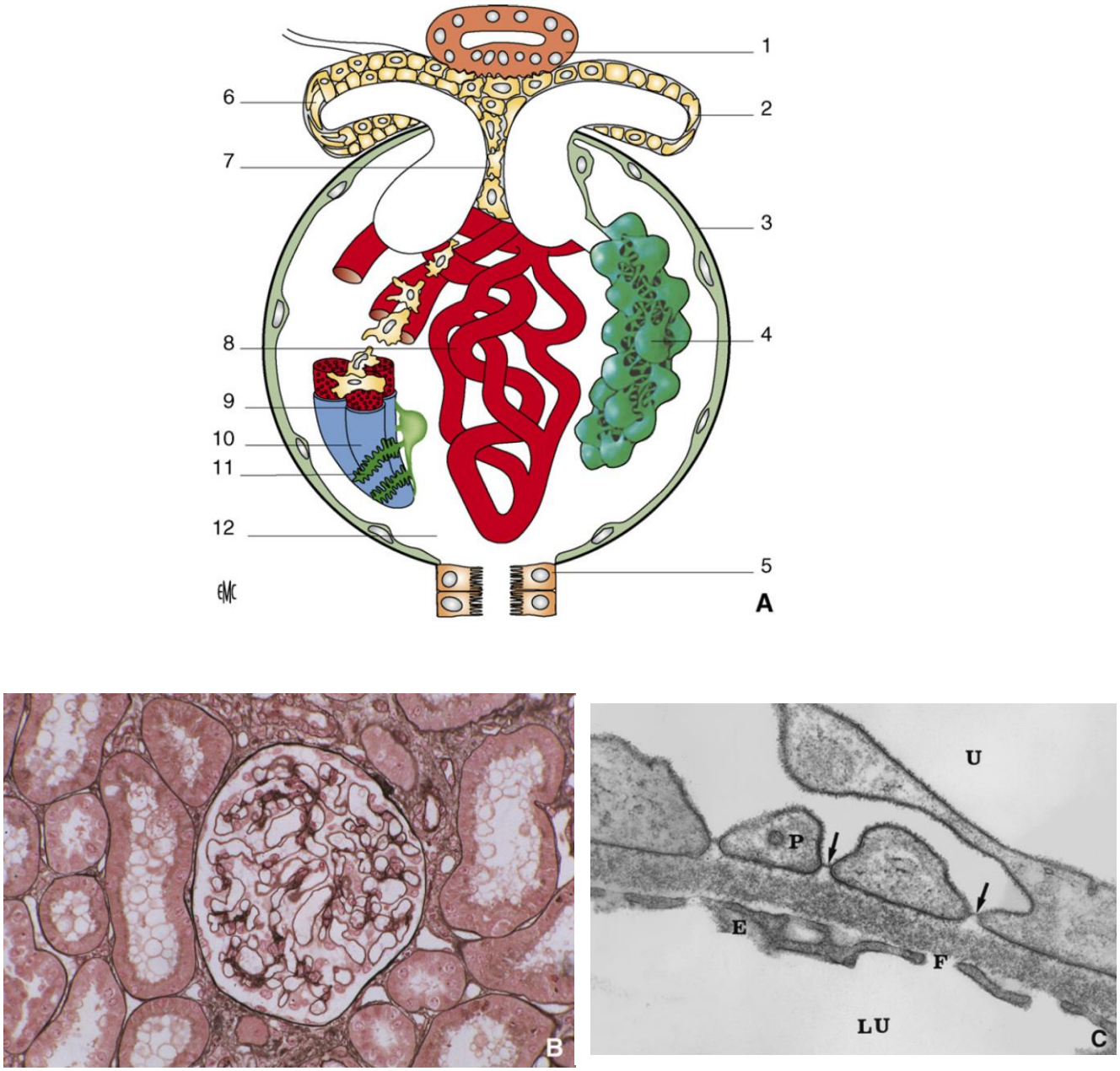


Figure 17: Organisation du glomérule
(Colombat *et al.* 2008)

(A). Schéma d'un glomérule normal montrant l'espace urinaire et sanguin séparés par la membrane basale glomérulaire (MBG). 1 : *macula densa* ; 2 : artériole efférente ; 3 : capsule de Bowman ; 4 : podocytes ; 5 : tube contourne´ proximal ; 6 : artériole afférente ; 7 : mésangium ; 8 : capillaires glomérulaires ; 9 : cellules endothéliales ; 10 : MBG ; 11 : pédicelles ; 12 : chambre urinaire. (B). Coloration argentique soulignant bien la MBG. (C). Barrière de filtration glomérulaire en microscopie électronique. LU : lumière capillaire ; E : cellule endothéliale ; F : fenêtre endothéliale ; P : pédicelle ; U : chambre urinaire.

1.2. Principe de l'autorégulation rénale

L'autorégulation rénale est le phénomène qui vise à maintenir le débit sanguin rénal (DSR) et le débit de filtration glomérulaire (DFG) malgré les variations de pression systémique. Pour cela, le DSR est finement régulé pour s'adapter aux fluctuations hémodynamiques et métaboliques de l'organisme. On observe donc un mécanisme de régulation commun au DSR et DFG qui dépend essentiellement des résistances vasculaires pré-glomérulaires mais aussi d'un certain nombre d'hormones. Deux mécanismes de régulation sont principalement observés : un mécanisme myogénique couplé à un rétrocontrôle tubuloglomérulaire.

- Réflexe myogénique

En cas de variation de la pression de perfusion rénale, on peut observer un réflexe myogénique au niveau de l'artériole afférente adaptant ainsi la pression artérielle rénale et les résistances permettant une régulation du débit. En effet, le maintien du DFG se fait grâce au maintien d'un débit sanguin constant en réponse aux variations de pression du sang par le biais des ajustements des résistances rénales, tout particulièrement au niveau des artérioles pré- (afférentes) et post-glomérulaires (efférentes). Ce réflexe fait intervenir de nombreux médiateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines (PG) qui sont plutôt vasodilatateurs ou des vasoconstricteurs comme l'angiotensine II (AT II), la noradrénaline (NE) et l'endothéline (Ichai *et al.* 2005). Ainsi un équilibre entre tous ces médiateurs permet une fine régulation de la circulation rénale en fonction des variations de pression systémique.

En réponse à une hypotension artérielle systémique, une vasodilatation de l'artériole afférente entraîne une diminution des résistances et est associée à une vasoconstriction de l'artériole efférente par l'AT II, qui aboutit au maintien d'une pression du capillaire glomérulaire constante. En cas d'hypertension artérielle systémique, les phénomènes de tonus musculaire sont inversés entre les artères afférentes et efférentes et les résistances augmentent. Cette association antagoniste des mouvements myogéniques entre l'artériole afférente et efférente permet de conserver un débit suffisant au niveau du glomérule et ainsi d'assurer la filtration glomérulaire.

Il a longtemps été admis que l'autorégulation rénale n'existait qu'au niveau de la circulation corticale (Mattson *et al.* 1993). Mais, des études expérimentales plus récentes

montrent qu'il existe une autorégulation de la circulation médullaire rénale (Majid *et al.* 1999). Eppel *et al.* (Eppel *et al.* 2003) ont comparé les effets de modifications de pression de l'artère rénale sur les débits rénaux cortical et médullaire mesurés par débitmétrie laser-doppler chez des lapins anesthésiés. Cette régulation du flux sanguin médullaire serait particulièrement impliquée dans le contrôle de la pression artérielle et de la réabsorption tubulaire de sodium (Persson *et al.* 2002).

- Rétrocontrôle tubuloglomérulaire (cf. Figure 18)

L'appareil juxta- glomérulaire constitue la base anatomo-fonctionnelle du rétrocontrôle tubuloglomérulaire (Kiil *et al.* 2002). Cela signifie qu'il représente la zone de contact étroite entre le tubule rénal et le pôle vasculaire glomérulaire du même néphron. Cette zone est constituée des cellules de la *macula densa*, situées à la partie terminale de la portion fine ascendante de l'anse de Henlé. Ces cellules détectent la concentration en NaCl dans le tube distal et agissent sur la boucle de rétrocontrôle tubuloglomérulaire (Lameire *et al.* 2007). Ainsi, lorsque la pression de perfusion du rein croit, il en résulte une augmentation du DFG, De plus, le flux et la charge en électrolytes (concentration en NaCl) des fluides arrivant au niveau de la partie distale du néphron augmentent. Les cellules de la *macula densa* répondent de manière paracrine à ces variations. Ce phénomène induit alors des modifications du tonus de l'artériole afférente et de la sécrétion de rénine par les cellules granulaires (Singh *et al.* 2010) et ainsi permettre le retour aux valeurs normales de DFG. Ce rétrocontrôle permet un maintien des valeurs du DFG et du DSR à des valeurs proches du point d'équilibre (Guénard *et al.* 2001, Loutzenhiser *et al.* 2006). On constate que des relations complexes entre les cellules de la macula densa et la microvascularisation glomérulaire permettent le maintien de l'autorégulation rénale. (Lameire *et al.* 2003).

Lors de situations pathologiques d'I/R telles que le choc septique et/ou hémorragique, l'autorégulation rénale n'est plus capable d'assurer convenablement son rôle. Une altération de l'autorégulation rénale est fréquemment citée dans ces conditions, avec une perte du maintien du DSR lors des variations de la pression artérielle moyenne (PAM).

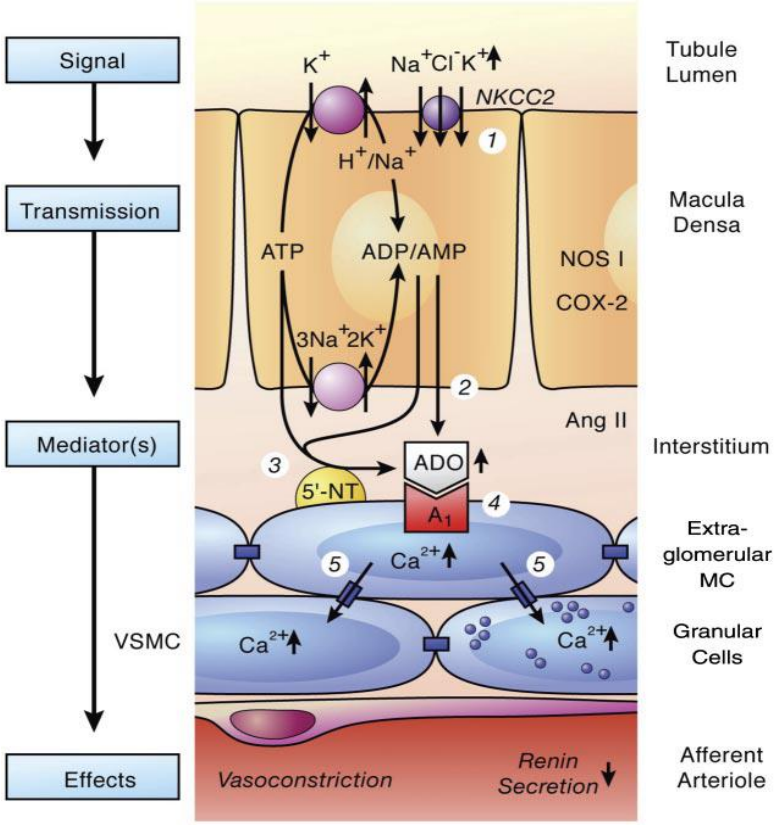


Figure 18: Mécanisme du rétrocontrôle tubuloglomérulaire
(Vallon et al. 2006)

- Médiateurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs

De nombreux médiateurs sont impliqués dans les mécanismes de régulation de l'hémodynamique rénale (Insho *et al.* 2008). Certains médiateurs sont plutôt vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, la noradrénaline ou l'endothéline et d'autres sont plutôt vasodilatateurs comme les prostaglandines rénales, les quinines et le NO. En situation physiologique, il existe un équilibre entre tous ces médiateurs, qui permettent de moduler cette régulation hémodynamique rénale. Le NO semble jouer un rôle fondamental dans cet équilibre, en se positionnant à la fois comme un médiateur direct et indirect (Dautzenberg *et al.* 2011).

Les deux systèmes neuro-hormonaux que sont le système rénine angiotensine et le système nerveux sympathique ont de puissants effets vasoconstricteurs sur le tonus vasculaire rénal: une baisse de pression de perfusion systémique stimule le système nerveux

sympathique et la sécrétion de rénine, conduisant à une élévation des résistances vasculaires rénales.

Au niveau du système rénine angiotensine, la sécrétion intrarénale de rénine et d'angiotensine II est réservée dans l'appareil juxtaglomérulaire (Baer *et al.* 1980). L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur des artères afférente et efférente. Ces effets hémodynamiques rénaux corticaux et médullaires passent par l'activation de récepteurs spécifiques qui sont localisés sur les vaisseaux rénaux. Cette activation induit une libération locale de médiateurs vasodilatateurs sur l'artère afférente tels que le NO et les prostaglandines (Sarkis *et al.* 2002). La vasodilatation de l'artère afférente et la vasoconstriction de l'artère efférente permet ainsi de maintenir constant le débit de filtration glomérulaire, malgré une diminution du débit sanguin rénal.

Au niveau du système nerveux sympathique, la stimulation des fibres nerveuses intrarénales, qui sont principalement des fibres adrénergiques, entraîne la libération d'adrénaline ou de noradrénaline (NE) qui conduisent à une vasoconstriction rénale corticale via l'activation des récepteurs α-adrénergiques intrarénaux corticaux (Malpas *et al.* 1998). La sensibilité aux stimuli nerveux est bien moindre dans la vascularisation médullaire rénale que celle de la corticale. Les modifications du flux médullaire pourraient prendre de l'importance dans certaines situations pathologiques (insuffisance cardiaque, hypertension artérielle, choc hémorragique (Malpas *et al.* 1998).

Dans le cas d'un apport sodé exogène normal, le NO endogène est capable de prévenir la vasoconstriction engendrée par l'inhibition de la COX-2 et donc des prostaglandines vasodilatatrices (Lopez *et al.* 2003), modulateurs du DSR. Ces prostaglandines ont d'étroites interrelations avec les hormones vasoconstrictrices (noradrénaline, angiotensine II) et sont plus particulièrement impliquées dans les mécanismes de régulation à long terme.

1.3. Conséquences rénales avec un épisode d'ischémie/reperfusion

L'atteinte ischémique est la cause majeure de l'insuffisance rénale aiguë (IRA). Elle est fréquemment associée aux états de chocs et est généralement liée à un mauvais pronostic. L'IRA représente une situation clinique fréquente, associée à un fort taux de moralité en particulier lorsqu'elle est associée à une défaillance multi –viscérale (Brivet *et al.* 1996).

Sur le plan fonctionnel, c'est principalement durant la phase de reperfusion qu'apparaissent les lésions structurelles et biochimiques de l'I/R. Les lésions structurelles touchent l'endothélium, mais aussi les cellules épithéliales tubulaires, conduisant à une hyporéactivité vasculaire. La destruction partielle de l'épithélium rénal est due à la nécrose et à l'apoptose, à l'obstruction des tubules due à la desquamation des cellules dans la lumière du tube, à une perte des bordures en brosse du tubule proximal, à une perte de polarité des cellules, à une congestion des cellules endothéliales ainsi qu'à des thrombi vasculaires (Lerolle *et al.*, 2010). L'ensemble des phénomènes au niveau de l'endothélium et de l'épithélium provoque un état inflammatoire responsable d'une aggravation de la pathologie et probablement de sa persistance (Bonventre *et al.* 1998). L'activation du processus non spécifique de l'inflammation et l'altération des systèmes d'autorégulation provoquent un déséquilibre entre les médiateurs vasoactifs en faveur d'une vasoconstriction persistante, probablement liée à une réactivité accrue aux agents vasoconstricteurs et une faible réactivité aux agents vasodilatateurs (Bonventre *et al.* 2003) conduisant à une réduction de la filtration glomérulaire. L'induction de la NO synthase inductible (iNOS), source d'une production intense de NO a été impliquée dans la perte d'autorégulation. La production modeste de NO par la NO synthase endothéliale (eNOS) participe à l'autorégulation physiologique (Dautzenberg *et al.* 2011).

Enfin, l'impact de cette éventuelle altération de l'autorégulation sur les variations relatives des vitesses de circulations capillaires glomérulaires et péritubulaires est inconnu. La pertinence de cette dernière question dans le cadre de l'agression rénale après un choc hémorragique ou un sepsis est illustrée par les différences d'intensité des lésions histologiques entre les glomérules et les tubules : les lésions sont essentiellement tubulaires et très peu glomérulaires. L'absence de concordances lésionnelles entre ces deux compartiments pourrait, entre autre, s'expliquer par des différences de vascularisation.

2. NORADRENALINE ET CHOC SEPTIQUE

2.1. Généralités

La noradrénaline (NE) est un neuromédiateur du système sympathique. Comme la dopamine et l'adrénaline, elle appartient au groupe des catécholamines. C'est d'ailleurs la

catécholamine la plus utilisée dans les services de réanimation pour la correction des troubles hémodynamiques lors du choc septique (Lejus *et al.* 1991). Important vasopresseur, la NE possède des effets veinoconstricteurs et vasoconstricteurs artériels majeurs surtout à des doses élevées et des effets inotropes non négligeables (Myburgh *et al.* 2006). De part ces effets vasoconstricteurs, la NE est responsable d'une augmentation de la pression artérielle moyenne (MAP) avec de faibles modifications de la fréquence cardiaque (HR) et du débit cardiaque (Garnier *et al.* 2005). Le rétablissement d'une pression de perfusion satisfaisante à l'aide d'une perfusion de NE permet, dans la majorité des cas, d'améliorer les fonctions rénales et la diurèse.

2.2. Pharmacodynamie

La NE est un ligand des récepteurs α-adrénergique et β-adrénergique, et selon la dose utilisée, l'affinité de la NE sera plus marquée pour un type de récepteur ou l'autre. A forte dose, l'effet sur les récepteurs α est prédominant et est connu pour induire une vasoconstriction rénale intense et une réduction de la filtration glomérulaire chez l'animal normal (Leblanc *et al.* 1997). Tandis qu'à faible dose, l'effet β prédomine d'où une augmentation du débit cardiaque. (Leone *et al.* 2006). De plus, les récepteurs α-adrénergique et β-adrénergique sont divisés en sous groupes. La NE a plus de sensibilité pour les récepteurs α1 qu'α2, qui activent la protéine Gq ce qui augmente la production de calcium intracellulaire par l'intermédiaire de la phospholipase C. Il en résulte une contraction musculaire (Leone *et al.* 2006).

La pharmacodynamie de la NE est totalement imprévisible : les effets hémodynamiques observés pour un régime d'administration identique montrent une variabilité interindividuelle extrême (Beloeil *et al.* 2005). Ces données, associées à la pharmacocinétique rapide, imposent une utilisation de la NA en titration en fonction de l'effet recherché, en administration continue, puis un sevrage progressif (Kipnis *et al.* 2010).

2.3. Pharmacocinétique

Comme toutes les catécholamines, la NE est rapidement dégradée dans le sang par la monoamine oxydase ou recaptée au niveau présynaptique. La dégradation très rapide explique une demi-vie de l'ordre de la minute à quelques minutes (Kipnis *et al.* 2010).

2.4. Utilisation au cours du choc septique

La NE est la catécholamine de première intention dans les consensus nationaux et internationaux sur la prise en charge du choc septique (Dellinger et al. 2008). Ce choix prédominant de la NE fait suite aux études comparant l'utilisation de cette catécholamine *versus* la dopamine. La NE est responsable du rétablissement d'une pression artérielle moyenne minimale rapide et sans effets secondaires (Martin *et al.* 1993). Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques de la NE sur la fonction rénale au cours du choc septique (Albanèse *et al.* 2004) ainsi que sur l'hémodynamique rénale. En plus de ses effets vasoconstricteurs, la NE augmente la perfusion splanchnique et rénale (Martin *et al.* 1993). La normalisation de la résistance vasculaire rénale par la NE pourrait effectivement rétablir le débit urinaire (Martin *et al.* 1993). La NE est aussi associée à une diminution du taux de mortalité par rapport à la dopamine au cours des états du choc septique (Vasu *et al*. 2011).

3. METHODE D'ANALYSE DE LA MICROCIRCULATION RENALE

L'exploration de la microcirculation rénale devient indispensable afin de mieux comprendre la physiopathologie des différentes altérations possibles de l'autorégulation rénale. Jusqu'à maintenant les techniques basées sur l'étude de la microcirculation étaient très limitées. La technique SDF (*Sidestream Dark Field*) est une nouvelle technique permettant de visualiser le flux sanguin in vivo à l'échelle du capillaire. Cette technique a prouvé son efficacité dans l'exploration de la microcirculation du pli cutané dorsal chez le hamster comparé à la vidéo-microscopie à fluorescence (Groner *et al.* 1999). Cette technique ouvre probablement sur de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension de la microcirculation rénale.

3.1. Principe de l'imagerie SDF

Plusieurs mesures de la microcirculation en temps réel ont été réalisées pendant les expérimentations. Ces mesures sont effectuées de façon non invasive grâce à un dispositif dédié : le MicroScan® (MicroVision Medical). Le MicroScan® utilise une évolution de la technologie d'imagerie par Spectroscopie Orthogonale Polarisée (OPS), appelée *Sidestream Dark Field* (SDF). L'OPS et le SDF font appel à un petit microscope portable qui est appliqué sur un tissu couvert d'une fine couche épithéliale. La différence principale entre ces deux techniques réside dans la manière dont les tissus sont illuminés. Dans la technique SDF, l'optique est centrale et des diodes électroluminescentes (LED) sont placées sur le pourtour de son extrémité au contact du tissu (cf. Figure 19). Ces capteurs lumineux émettent une lumière verte de longueur d'onde 530 nm correspondant à l'absorption de l'hémoglobine érythrocytaire (cf. Figure 20). La lumière réfléchie par les couches superficielles ne peut atteindre l'optique et ne vient donc pas altérer l'image. La lumière reflétée par les couches profondes est également absorbée par l'hémoglobine permettant la visualisation des capillaires et veinules des couches superficielles. Les érythrocytes sont visualisés sous la forme de cellules sombres en mouvement (cf. Figure 21). Par conséquent, les globules rouges sont utilisés comme agent de contraste afin de visualiser le flux sanguin dans les microvaisseaux indépendamment de l'état d'oxygénation. L'utilisation d'une lumière stroboscopique permet d'obtenir des images plus nettes. La validation à été faite par comparaison avec des mesures obtenues par OPS.

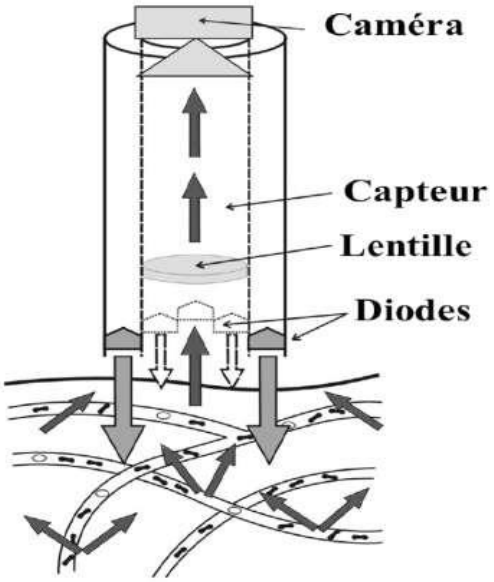


Figure 19: Schéma présentant les composants de l'imagerie SDF
(Elbers et al. 2006).

Flèches descendantes (claires): la lumière émise (polarisée), Flèches ascendantes (foncées): la lumière diffusée (dépolarisée).

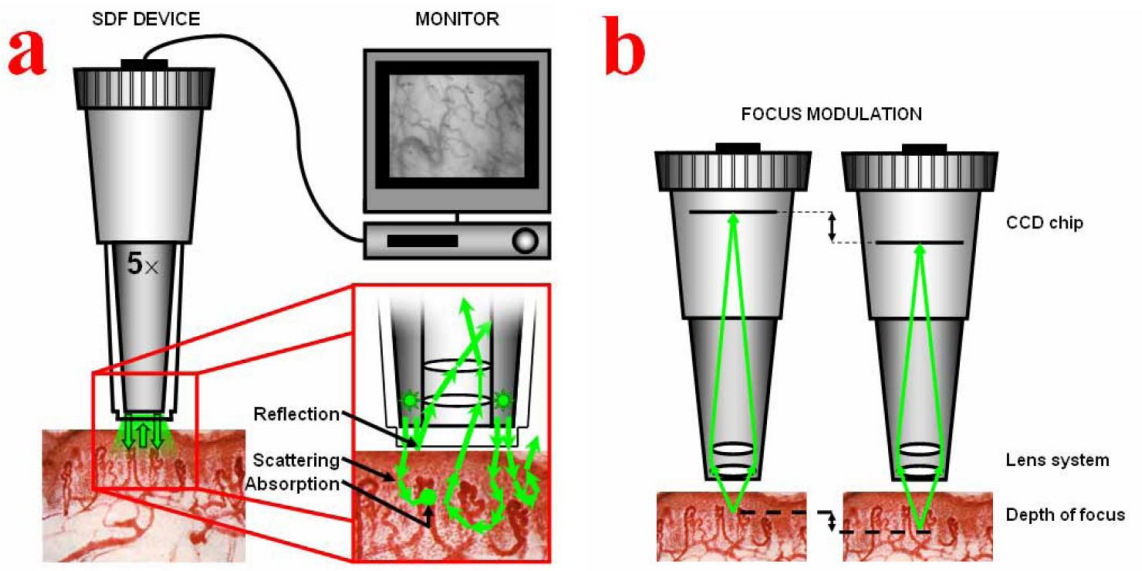


Figure 20: Schéma présentant le principe de l'imagerie SDF
(Goedhart *et al.* 2007)

(a) Le dispositif d'imagerie SDF est équipé d'une lentille avec un objectif X5 contenant une sonde. L'imagerie observant la microcirculation tissulaire utilise des diodes électroluminescentes dont la lumière est représentée par l'éclairage vert. Les images sont enregistrées, visualisées à l'aide d'un ordinateur. Après pénétration dans le tissu, la lumière subit des évènements de diffusion (indiquées par les flèches) et peut être absorbée par l'hémoglobine des érythrocytes (indiquées par des points). Le système de lentilles est optiquement isolé de l'éclairage à LED afin qu'il n'y ait pas de contamination des images microcirculatoires par les réflexions de surface. (b) Dans le dispositif, la puce CCD peut être translatée axialement par rapport au système de lentille fixé dans la pointe de la sonde SDF pour affiner la profondeur de champ.

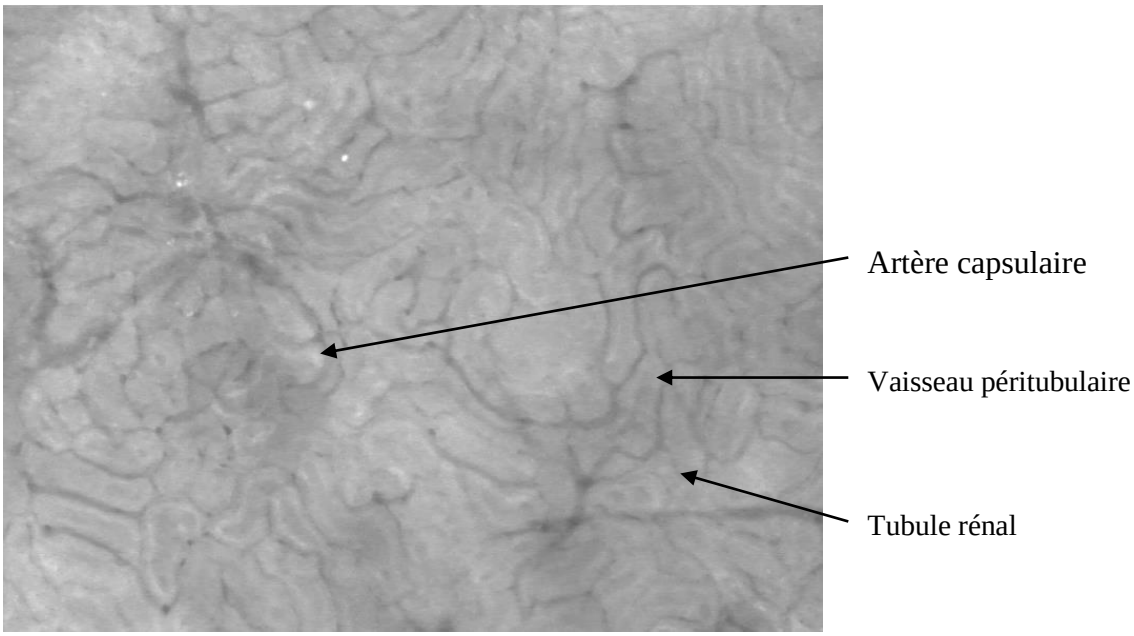


Figure 21: Exemple d'acquisition de microcirculation en imagerie SDF

Figure 22: MicroScan® SDF, appareil d'acquisition

(www.MicroVisionMedical.com)

Ce dispositif autonome comprend une source lumineuse coaxiale avec un objectif de diamètre fin protégé par un embout plastique stérile à usage unique en contact avec la muqueuse. Les acquisitions sont réalisées à la surface du rein. La stabilité du MicroScan® est renforcée grâce à une bague métallique multiperforée et stérilisable qui s'adapte à l'extrémité du cache stérile de la sonde d'acquisition (cf. Figure 22) et par laquelle on exerce une aspiration calibrée qui maintient l'objectif au contact direct du rein (Lindert *et al.* 2002). Grâce à ce dispositif, il est possible de maintenir l'objectif immobile au contact de la muqueuse pendant plus de 60 secondes de façon totalement atraumatique et sans incidence sur les résultats obtenus. L'absence de conséquence de l'aspiration sur les données microcirculatoires a été rapportée pour une dépression de 100 mmHg (Ince *et al.* 1993). Les images de microcirculation sont recueillies sous forme de vidéos numériques à la fréquence de 25 images par seconde, enregistrées en temps réel sur un ordinateur portable au format AVI afin d'éviter les pertes de qualité engendrées par une compression informatique. Cinq séquences de 10 à 20 secondes sont enregistrées. Les cinq séquences d'une étape donnée sont

enregistrées sur des zones distinctes prises au hasard sur l'ensemble du revêtement rénal. Le choix délibéré de ne pas se focaliser sur la même région d'intérêt aux différentes étapes est motivé par des impératifs techniques et des arguments physiopathologiques :

- ✓ la région d'intérêt visualisée par le MicroScan® lors d'une acquisition a des dimensions de l'ordre de la centaine de micromètres rendant illusoire toute tentative de « retrouver » une région d'intérêt après la mobilisation du patient,
- ✓ l'hétérogénéité de la microcirculation est un paramètre important de l'évaluation qualitative et quantitative (Boerma *et al.* 2005). Il paraît nécessaire d'étudier plusieurs sites.

3.2. Description des conditions de recueil des paramètres

L'interprétation des vidéos était réalisée en aveugle vis-à-vis des autres données recueillies. Le recueil des données statistiques à partir des signaux lumineux enregistrés par la caméra SDF est réalisé avec le logiciel AVA® 3.0 (*Automated Vascular Analysis*, MicroVision Medical) qui est développé par l'Academic Medical Center de l'Université d'Amsterdam (Pays-Bas). Ce logiciel permet une reconnaissance semi-automatique des contours vasculaires et le calcul de paramètres considérés comme pertinents dans les derniers consensus sur l'étude de la microcirculation (De Backer *et al.* 2007) : diamètre des vaisseaux, densité capillaire, vitesse de circulation et autres critères liés à la régularité du flux sanguin.

Figure 23: Analyse des séquences vidéo obtenues avec le logiciel AVA® 3.0 : cartographie des vaisseaux

1- L'opérateur commence par optimiser la vidéo étudiée. Cette étape comprend une correction automatique de l'arrière-plan et du contraste de l'image afin d'optimiser l'histogramme des niveaux de gris et de faciliter l'analyse automatisée. Le logiciel adapte l'échelle de niveaux de gris afin d'obtenir une répartition gaussienne de ces niveaux.

2- On sélectionne ensuite parmi les 30 secondes de vidéo une série de 250 images consécutives, soit 10 secondes de vidéo, a priori la plus stable, afin d'en effectuer une stabilisation informatique. La stabilisation de la vidéo permet de compenser les éventuelles vibrations et secousses de la vidéo. Elle écrête les bords des images, mais conserve une échelle inchangée. Seule cette portion stabilisée de 10 secondes est utilisée dans la suite de l'analyse. Le rapport entre les surfaces des images avant et après stabilisation définit un critère-qualité de la stabilité de l'acquisition de la vidéo. L'observateur obtient donc une image moyenne, résultante des 100 images stabilisées.

3- La reconnaissance automatique des capillaires est alors effectuée par le logiciel suite à une cartographie des vaisseaux constituant la vidéo. Cette cartographie permet une reconnaissance optimale des contours des capillaires obtenue grâce à un moyennage des images. À l'issue de cette étape, le logiciel est capable de fournir : la longueur totale des vaisseaux, la surface de l'image, la densité capillaire fonctionnelle et la vitesse de circulation (cf. Figure 23).

4- Dans les régions où un flux sanguin est visible, l'observateur choisit 5 vaisseaux dont il mesure la vitesse de circulation. Seule l'étude des petits vaisseaux est pertinente pour une analyse comparative de la microcirculation selon les données de la littérature (De Backer *et al.* 2007).

La vitesse du sang est mesurée quantitativement à l'aide d'un diagramme espace-temps. Dans cette méthode, des profils d'intensité le long de la ligne médiane incurvée sont dessinés comme une ligne droite verticale (axe spatial) à côté de l'autre pour chaque trame dans le segment vidéo sélectionné (axe du temps). La figure ci-dessous montre un exemple de diagramme espace-temps à la suite de cette procédure (cf. Figure 24). Le logiciel compense la courbure du vaisseau lors de l'affichage du diagramme espace-temps. Si le débit sanguin semble interrompu, par exemple, en raison de la présence de lacunes de plasma et de globules blancs, il en résulte des lignes lumineuses sur le diagramme espace-temps. La description est la même pour les lignes sombres, qui sont créés par les globules rouges qui absorbent la lumière fortement par rapport à l'arrière-plan. La vitesse du sang est calculée à partir de la pente de la ligne : $v = \Delta s/\Delta t = \tan\alpha$, avec Δs la longueur, Δt l'intervalle de temps et α la pente. En effet, le logiciel choisit de représenter le vecteur vitesse par l'hypoténuse d'un triangle rectangle dont les deux autres côtés caractérisent le mouvement du globule rouge à savoir la distance parcourue (longueur) et la durée (temps) (cf. Figure 24 et 25).

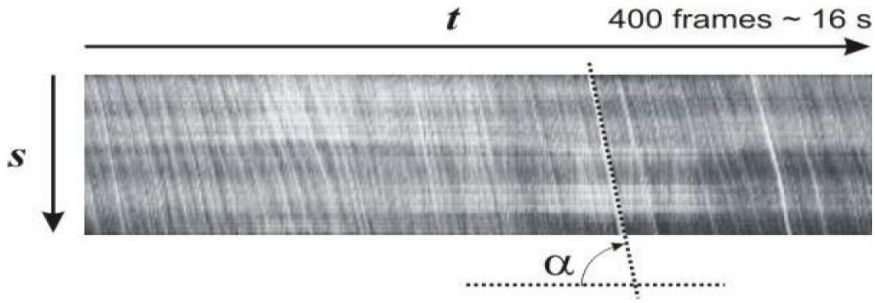


Figure 24: Diagramme espace-temps avec le logiciel AVA® 3.0.

Il a été obtenu en traçant les pixels à la verticale d'un axe du vaisseau. La dimension temps (horizontal) est obtenue en répétant ce processus pour une série d'enregistrements vidéo.

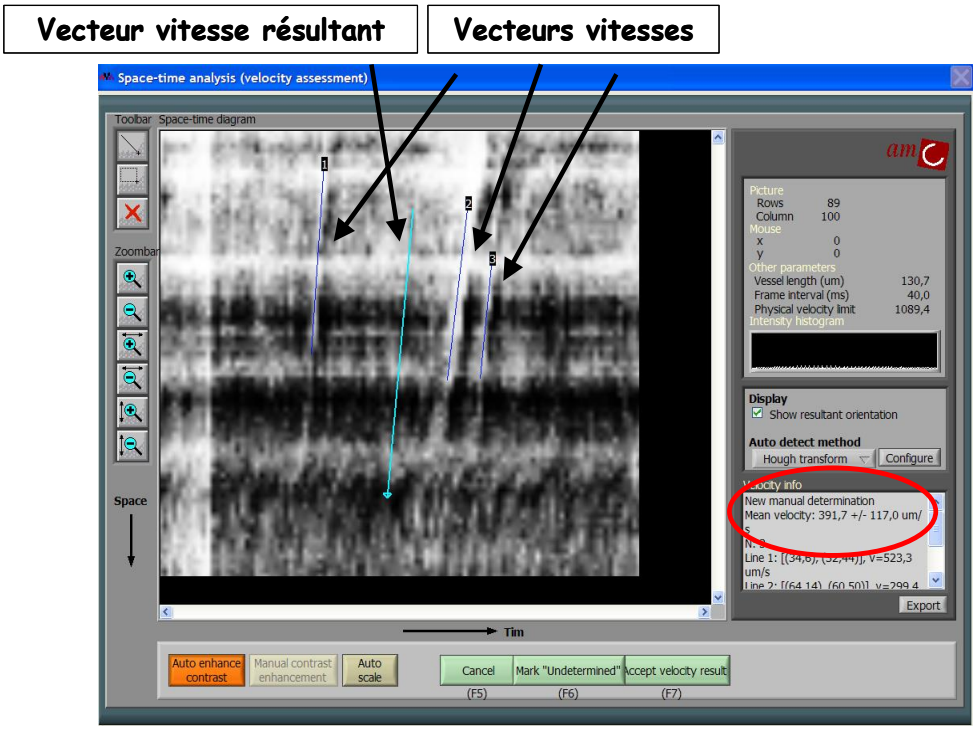


Figure 25: Analyse des séquences vidéo obtenues avec le logiciel AVA® 3.0 : diagramme espace-temps

Pour deux images successives d'un objet en mouvement de la vidéo, il est impossible de dire avec une certitude absolue si l'objet de la seconde image est bien celui détecté à la première image. Si nous observons plus de deux images successives et que l'objet bouge avec un déplacement plutôt constant entre les images, il est probable que nous observons le même objet. Il a donc été choisi trois images pour déterminer la vitesse. Le logiciel calcule la vitesse à partir de trois images successives et donc sur une durée égale à 3*T*.

Pour mesurer la vitesse à l'aide d'un diagramme d'espace-temps, il faut des images vidéo suffisantes pour une analyse adéquate. Les fragments vidéo sont sélectionnés aussi grands que possible en faisant glisser la sélection fragment poignées blanches dans la fenêtre d'analyse. Le programme affiche la vitesse limite physique et les paramètres dont il dépend étant la longueur du vaisseau (L en mm) et la fréquence des défilements des images (f) (Europe: 25 Hz,). La limite de la vitesse physique (v_{max}), tel qu'il est utilisé par AVA, est définie :

$$v_{max} = \frac{L * f}{3} \quad [\mu m/s]$$

Dans le cas d'une altération de la microcirculation, la répartition non uniforme des globules rouges aux différents embranchements asymétriques, est enregistrée sous forme d'un ralentissement de la circulation dans les capillaires prise par caméra SDF. Ce ralentissement est calculé par une diminution de la vitesse microcirculatoire.

L'altération de la microcirculation dans le sepsis a été montrée dans divers modèles expérimentaux (Drazenovic *et al.* 1992). L'administration d'endotoxine, tout comme la péritonite, induisent une diminution de la densité de perfusion capillaire, une augmentation du nombre de vaisseaux non perfusés ainsi qu'une hétérogénéité de la distribution spatiale et temporelle de la perfusion capillaire (Madorin *et al.* 1999). La visualisation directe des capillaires sublinguaux par vidéomicroscopie (OPS et SDF) ont permis de mieux caractériser ces altérations. La densité capillaire est diminuée et touche principalement les petits capillaires (< 20 mm) où le flux est soit absent, soit intermittent (De Backer *et al.* 2002). La répartition des capillaires perfusés est hétérogène, et associée à des zones de perfusion maintenue voire augmentée (shunt unit), à des régions où le flux est absent ou intermittent (*weak unit*).

4. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Lorsque le rein est agressé, après un choc hémorragique ou en cas de sepsis notamment, une modification de la réponse rénale aux stimuli vasoconstricteurs et vasodilatateurs a été observée. Une altération de l'autorégulation rénale est fréquemment citée dans ces conditions, avec une perte du maintien du débit sanguin rénal lors des variations de pression artérielle. Différentes études expérimentales ont pu clairement évaluer l'autorégulation rénale en situation physiologique, il n'en est rien au cours des états de choc et en particulier lors de la phase de reperfusion des états de choc, lorsque la réponse inflammatoire est maximale. Cette étude est réalisée sur un modèle animal qui traduit l'état septique observé chez l'Homme afin de mieux comprendre le phénomène de l'altération de l'autorégulation rénale au cours de cette pathologie. Notre étude entre donc dans le cadre d'un projet stratégique transversal (expérimental) qui vise à évaluer les perturbations hémodynamiques rénales aux niveaux macrocirculatoire et microcirculatoire dans le but de :

- ✓ Décrire, pour la première fois, les variations hémodynamiques dans les territoires capillaires péritubulaires lors des variations de pression dans l'artère rénale.

- ✓ Décrire les modifications entraînées par une agression rénale (choc hémorragique et sepsis) sur les réponses microvasculaires capillaires glomérulaires et péritubulaires face aux variations de pression dans l'artère rénale.

- ✓ Evaluer les effets thérapeutiques de la noradrénaline dans le même modèle.

5. ARTICLE : *"Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats"*

Burban *et al. Critical Care* 2013, **17**:R139
http://ccforum.com/content/17/4/R139

CRITICAL CARE

RESEARCH Open Access

Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats

Mélanie Burban[1], Jean-François Hamel[2], Maher Tabka[1], Mathilde Renou de La Bourdonnaye[1], Agnès Duveau[1], Alain Mercat[2,3], Paul Calès[1], Pierre Asfar[1,3,4] and Nicolas Lerolle[1,3,4*]

Abstract

Introduction: The relationships between systemic hemodynamics and renal blood flow and renal microcirculation are poorly known in sepsis. Norepinephrine (NE) infusion may add another level of complexity.

Methods: Ventilated and anesthetized rats were submitted to various mean arterial pressure (MAP) steps by blood removal, in presence and absence of sepsis and/or NE. Renal blood flow (RBF) and blood velocity (Vm) in renal cortical capillaries (using Sidestream Dark Field Imaging) were measured. Data were analyzed using linear mixed models enabling us to display the effects of both the considered explanatory variables and their interactions.

Results: Positive correlations were found between MAP and RBF. Sepsis had no independent impact on RBF whereas norepinephrine decreased RBF, regardless of the presence of sepsis. The relationship between MAP and RBF was weaker above a MAP of 100 mmHg as opposed to below 100 mmHg, with RBF displaying a relative "plateau" above this threshold. Sepsis and NE impacted carotid blood flow (CBF) differently compared to RBF, demonstrating organ specificity. A positive relationship was observed between MAP and Vm. Sepsis increased Vm while nNE decreased Vm irrespective of MAP. Sepsis was associated with an increase in serum creatinine determined at the end of the experiments, which was prevented by NE infusion.

Conclusion: In our model, sepsis at an early phase did not impact RBF over a large range of MAP. NE elicited a renal vasoconstrictive effect. Autoregulation of RBF appeared conserved in sepsis. Conversely, sepsis was associated with "hypervelocity" of blood flow in cortical peritubular capillaries reversed by NE infusion.

Keywords: Sepsis, animal, acute renal failure, hemodynamic, experimental, norepinephrine

Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a major complication of sepsis and is associated with increased mortality [1]. Renal vascular dysfunction has emerged as a major component of AKI [2-4]. First, on a 'macrovascular' level, renal response to vasoconstrictor or vasodilator substances at the arterial and arteriolar level is altered in the presence of sepsis toward an increased vasopressive response [5]. Second, on a 'microvascular' level, several recent lines of evidence have shown that abnormalities in cortical peritubular capillary flow occur very early in sepsis [6-8].

In animal models of sepsis, renal blood flow (RBF) is preserved provided that cardiac output is maintained with vascular fluid loading [2]. Nonetheless, the abovementioned alterations in vasoreactivity may render the kidneys unable to protect themselves against additional ischemic insults during changes in systemic perfusion pressure: for instance, mean arterial pressure (MAP) variations may result in a rapid drop in RBF and/or glomerular filtration rate (GFR). Indeed, suboptimal perfusion pressure is common in patients with septic shock and has been shown to be associated with renal dysfunction [9]. Most animal studies on RBF in sepsis have used either no fluid loading leading to profound hemodynamic abnormalities or

* Correspondence: Nicolas.lerolle@univ-angers.fr
[1]Laboratoire HIFIH, UPRES EA 3859, PRES l'UNAM, IFR 132, Université Angers, 49000 Angers, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Burban et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

massive fluid resuscitation leading to 'overcorrection' of cardiac output and arterial pressure, such that the impact of variation of blood pressure over a range relevant to the human setting remains unknown [2].

Aside from RBF, the relationship between systemic hemodynamics and microcirculation remains a matter of debate. In experiments performed in various organs, the link between systemic hemodynamics and microcirculation has been relatively vague although the latter was found to be affected by cardiac output and arterial pressure when these were critically altered [10]. Most observations in kidneys, showing a microcirculatory defect in sepsis conditions, have been conducted in non-resuscitated animals such that cardiac output, and hence RBF, may have been substantially diminished [7,8].

As a result, the manner in which frequent MAP variations in sepsis impact both RBF and microcirculation is unknown. Moreover, septic shock patients require vasoconstrictor infusion, mostly norepinephrine (NE), in addition to fluid loading, to maintain blood pressure which may add another level of complexity to the vascular abnormalities observed in sepsis [11].

Thus, in order to explore the relationships between variations in MAP over a clinically relevant range and renal macro- and cortical microcirculations, we conducted a study on a rat model of sepsis with and without NE infusion. Renal cortical peritubular capillary blood flow was monitored using Sidestream Dark Field (SDF) imaging [12]. Our main objectives were: (1) to assess the existence of an autoregulation phenomenon between MAP and RBF in sepsis and whether it is impacted by NE; and (2) to evaluate if changes in MAP impact cortical microcirculation in a manner similar to RBF in septic condition, in presence/absence of NE.

Materials and methods

Animal preparation

Adult male Wistar rats, weighing 250 ± 20 g (aged approximately 8 weeks), were housed under 12-h light/dark cycles in the animal facility of the University of Angers (France). All experiments were performed in compliance with the European legislation on the use of laboratory animals and have been approved by the Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale (Regional Animal Ethics Committee) of Nantes, France (approval number: 2011.19).

The rats were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (50 mg/kg, Trapanal®, Nycomed, Germany) associated with local anesthesia for each incision (Lidocaïne®1% Astra Zenecca) and placed on a homeothermic blanket system to maintain rectal temperature between 36.8°C and 37.8°C. A tracheotomy was performed and animals were mechanically ventilated (Harvard Rodent 683 ventilator, Harvard Instruments, South Natick, MA, USA) with supplemental oxygen in order to maintain PaO_2 around 100 mmHg and PCO_2 at 35-45 mmHg. The left carotid artery and renal artery were exposed, and 2.0 mm transit-time ultrasound flow probes (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) were placed to continuously measure carotid blood flow (CBF) and RBF. The left femoral artery was cannulated and connected to a transducer (Edwards LifesciencesTM, Irvine, CA, USA) allowing continuous measurements of MAP and heart rate (HR). The homolateral femoral vein was cannulated and maintenance of fluid was performed with a perfusion of 1.2 mL/h of 0.9% NaCl. Arterial blood gases (Blood gas analyzer, Osmetech Opti™ CCA, Pantin, France) were performed after animal preparation in order to adjust for mechanical ventilation. The left kidney was exposed and a SDF imaging camera (MicroScan™; MicroVisionMedical, Amsterdam, The Netherlands) was positioned on the surface. Special attention was paid to apply the lowest pressure on the kidney surface with the camera.

Experimental protocol

This prospective experimental study randomly allocated rats into four groups (n = 10 per group):

- In the CT (control) group, after a baseline step (at a typical MAP of 130 mmHg in Wistar rats), MAP was lowered by blood removal via the arterial catheter to reach three successive predefined MAP steps lasting 10 min each: 100 mmHg, 70 mmHg, and 40 mmHg. Shed blood (stored in a syringe containing heparin 200 UI) was then reinfused. During the MAP steps, small amounts of blood were occasionally withdrawn or reinfused to maintain MAP at the predefined levels.

- In the Sepsis group, cecal ligation and puncture was performed immediately after animal preparation. In brief, under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed. The cecum was partially ligated and perforated with an 18-gauge needle and gently squeezed to extrude a small amount of feces. The cecum was then returned to the peritoneal cavity and the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. MAP was then allowed to decrease spontaneously to 90 mmHg at which point gelatin (Gelofusine 4%, B. Braun Medical, Boulogne, France) was perfused to restore a MAP of 130 mmHg, which was considered as the baseline step in this group. The experimental protocol described for the CT group was then applied.

- In the CT+NE (control+NE) group, continuous intravenous administration of NE was titrated after animal preparation to obtain a MAP of 160 mmHg (baseline step). The experimental protocol described for the CT group was then performed with a first step at MAP 130 mmHg.

- In the Sepsis+NE group, the protocol described for the Sepsis group was applied, NE being started to obtain

a MAP step of 160 mmHg (baseline step). This was performed immediately after gelatin infusion, which had enabled to restore a MAP of 130 mmHg after the initial MAP drop. The experimental protocol was then applied as above.

At each step (including baseline), three sets of simultaneous measurements were performed for MAP, HR, CBF, RBF, and cortical microcirculatory velocities (Vm, see below). At the end of the experiments, animals were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital and blood was drawn for creatinine measurements (Creatininase-Peroxydase, C16000 Abbott, IL, USA).

Microcirculation imaging and peritubular blood velocity measurements

Video sequences of 10-s duration were obtained with a SDF camera for every set of measurements. The camera was slightly displaced between each sequence to allow observation of different regions in the superficial area of the cortex. Digital sequences were stored and analyzed off-line with specifically-designed software (AVA 3.0, MicroVisionMedical, Amsterdam, The Netherlands). Video analyses were performed blinded to both group and step. After image stabilization and averaging, displacements of blood cells in cortical peritubular capillaries were observed (see Additional file 1, Video S1). White blood cell displacement through the capillaries creates an observable artifact among red blood cells; the velocity of this artifact can be measured using time-frame analysis, as previously reported. In capillaries (blood vessel diameter <10 μm), blood cell velocity can be considered as blood velocity [13]. For each video sequence, blood velocities were measured in five to 10 different blood vessels and averaged. In a pre-study, intra-observer reproducibility testing for blood velocity measurements over a video sequence displayed good reliability of measurements (inter-class correlation 94%; 95% CI 92-99%). Inter-observer reproducibility testing also displayed good agreement between operators (inter-class correlation 90%; 95% CI 88-97%).

Statistical analyses

Data are presented as mean ± standard deviation, and *n* (%) as appropriate. Quantitative data were compared with the Kruskall-Wallis test or Wilcoxon test as appropriate, and qualitative data with the Fisher exact test.

Different measurements carried out on a same rat are necessarily correlated, whether made for the same blood pressure level or not. As standard statistical models (such as linear models) are based on the observations independence assumption, their use was deemed inappropriate. Mixed models are particularly suitable for repeated measures and for modeling correlations between measurements and were thus used herein [14]. In a first model, we assessed the determinants of RBF among MAP, Sepsis, NE infusion and tested whether the relationship between MAP and RBF was different above and below a MAP of 100 mmHg, by testing the interaction between MAP and this threshold (hereafter referred as T100 mmHg). In a second model, we assessed the determinants of CBF among the same parameters as above (MAP, Sepsis, NE infusion, and interaction between MAP and T100 mmHg). In a third model, we assessed the determinants of Vm among MAP, Sepsis, and NE infusion. These models allowed to display the effects of both the considered explanatory variables and their interactions (considered as fixed effects) while simultaneously modeling random effects. Random effects describe the difference between actual values of the studied parameters as measured during the experiments and theoretical values predicted by the model when entering the fixed effects. The random effects were broken down into inter-animal variability (describing how different animals respond differently to the same stimuli), and intra-animal variability (describing how a same animal responds differently to the same stimuli, as estimated from the three measurements at each MAP step). Intra-animal variabilities were estimated depending on the septic and NE status of the animals. The models were constructed by minimizing Akaïke criteria. Only significant interactions between variables were retained and presented. The models presented were validated by verifying the normality and homoscedasticity assumptions of the residuals. The significance of covariates was tested by the use of Wald tests. All tests were performed with a type I error set at 0.05. Analyses were performed using Stata 11.0 (StataCorp LP, TX, USA).

Results

Hemodynamic measurements: MAP steps, heart rate, NE infusion

The MAP targets were achieved successfully in all four experimental groups (Figure 1). The volume of Gelofusine required to obtain a MAP baseline step of 130 mmHg in septic animals was 4.2 ± 4 mL in the Septic group and 3.6 ± 2 mL in the Sepsis+NE group (before NE was initiated). After reperfusion of shed blood, MAP was significantly lower in comparison to baseline in all groups except CT (CT 127 ± 26 *vs.* 129 ± 5, $P = 0.8$; Sepsis 100 ± 35 *vs.*130 ± 4, $P = 0.002$; CT+NE 109 ± 41 *vs.* 161 ± 7, $P = 0.01$; Sepsis+NE 119 ± 30 *vs.* 160 ± 8 mmHg, $P = 0.004$). MAP had no significant effect on HR whereas sepsis and NE infusion were associated with a significant increase in HR (data of the linear mixed model not shown; for example, HR at baseline: CT 324 ± 63; Sepsis 427 ± 51; CT+NE 342 ± 45; Sepsis+NE 371 ± 66 bpm). The NE infusion rate required to obtain a MAP of 160 mmHg at baseline was 6.2 ± 3.8 μg/kg/min in CT+NE animals and 24.05 ± 5.9 μg/kg/min in Sepsis+NE animals ($P = 0.0002$). Duration of the experiment from end of preparation to

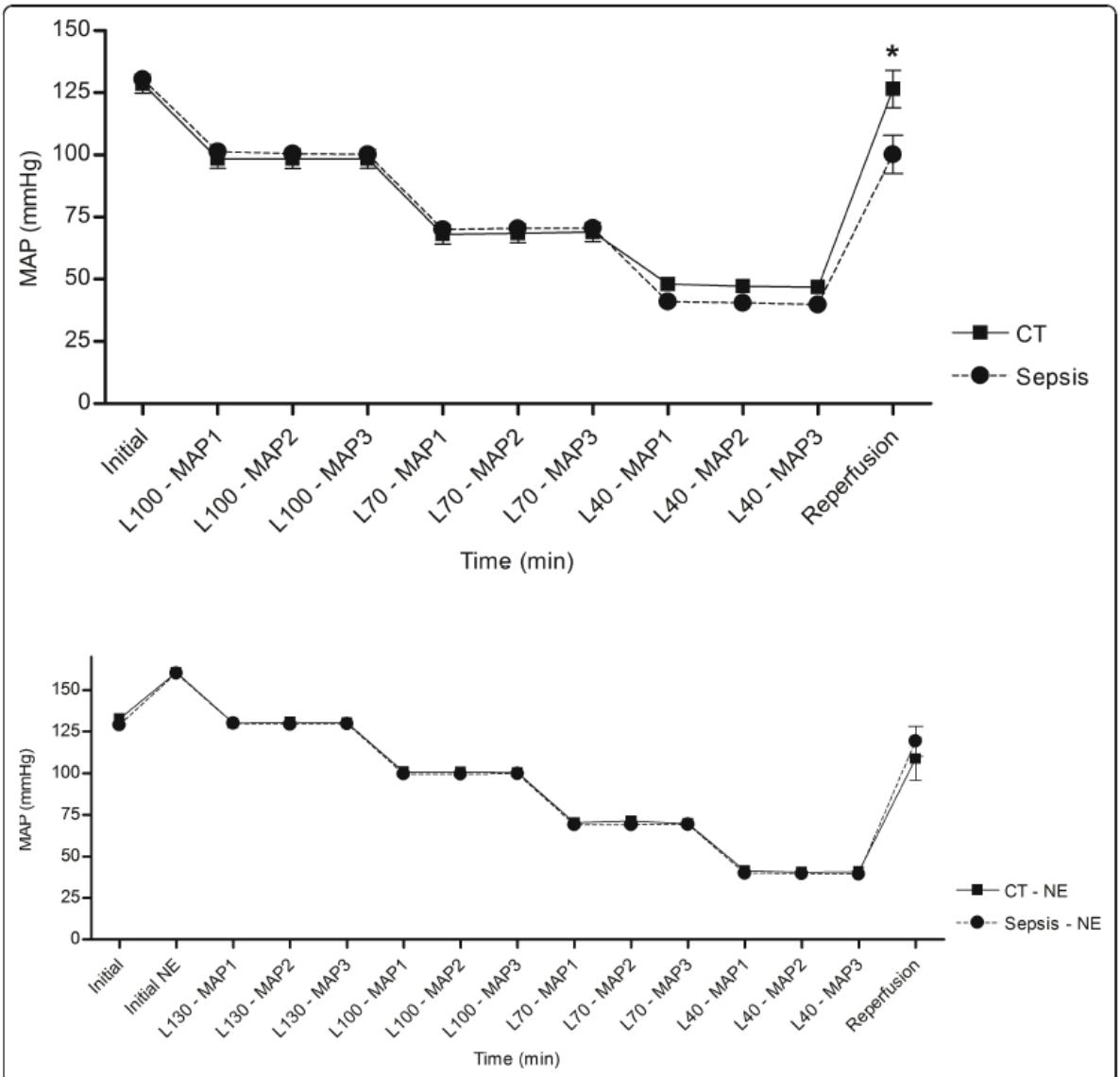


Figure 1 Graphical representation of mean arterial pressure (MAP) across the different experimental groups. Baseline (see materials and methods) measurements were considered as time = 0. CT: control; L: level; NE: norepinephrine.

reperfusion was approximately 70 min in CT and 90 min in CT+NE. This duration increased to 300 ± 69 min and 359 ± 97 min (P = 0.005) in Sepsis and Sepsis+NE, respectively. Animal weight did not differ between the various groups (CT 260 ± 30 g, Sepsis 246 ± 20 g, CT+NE 247 ± 23 g, Sepsis+NE 266 ± 20 g, P = 0.45).

Macrocirculatory impact of MAP steps: renal and carotid blood flow

RBF and CBF values according to measured MAP are shown in Figure 2, while numerical data are presented in Additional file 2 (Table S1). Results of the mixed linear regression models disclosing the effect of MAP, sepsis, and NE on RBF and on CBF are shown in Table 1. Coefficients presented here apply to a first order equation: for example, the variation in RBF when MAP increases by 1 mmHg is 1 × 0.05 mL/min. Identically, for NE infusion, RBF variation in presence/absence of NE is -0.9 × (1 in presence of NE, 0 in absence of NE) mL/min. Thus, regarding RBF, the model shows that MAP significantly increased RBF, regardless of NE infusion and septic status (no significant interaction between MAP

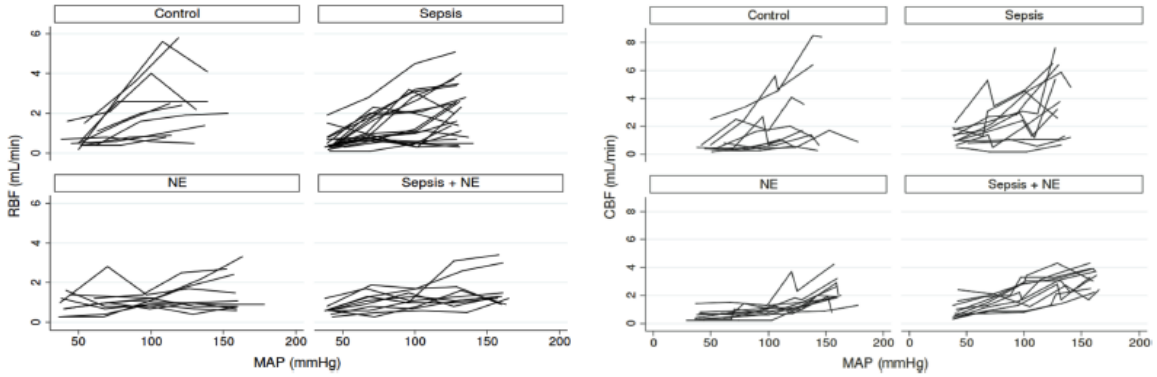


Figure 2 RBF (left kidney), CBF (left carotid), and Vm according to MAP in the different experimental groups. Only the first of the three sets of measurements for each MAP step are shown. However, the statistical analyses presented in the article take into account all of the measurements. CBF: cerebral blood flow; MAP: mean arterial pressure; RBF: renal blood flow; Vm: microcirculatory velocity.

and NE or between MAP and Sepsis detected by the model). The MAP-dependent increase in RBF varied according to the 100 mmHg MAP threshold: when MAP was >100 mmHg, the increase in RBF in response to a rise in MAP was lower than that observed when MAP was <100 mmHg: when MAP was >100 mmHg, increasing blood pressure by 1 mmHg increased RBF by 0.04 mL/min (0.05 minus 0.01: effect of MAP plus effect

Table 1 Linear mixed models for renal blood flow (RBF) and cerebral blood flow (CBF).

RBF	Coefficient	95% confidence interval	*P*
Fixed effects			
MAP (mmHg)	0.05	0.01; 0.15	<0.001
NE infusion	-0.90	-1.24; -0.57	<0.001
Sepsis	-0.26	-0.72; 0.2	0.3
Interaction MAP×T100 mmHg[a]	-0.01	-0.01; -0.001	0.001
Random effects			
Interindividual standard deviation	0.78	0.61; 0.98	
Intraindividual standard deviation			
Control	1.45	1.27; 1.7	<0.0001[a]
Sepsis	0.9	0.81; 1	
NE infusion	0.53	0.46; 0.6	
NE+Sepsis	0.39	0.35; 0.44	
CBF	**Coefficient**	**95% confidence interval**	***P***
Fixed effects			
MAP (mmHg)	0.02	0.02; 0.03	<0.001
NE infusion	1.83	1.24; 2.40	<0.001
Sepsis	0.76	0.15; 1.37	0.01
Interaction MAP × NE[c]	-0.02	-0.02; -0.01	<0.001
Interaction MAP×T100 mmHg[a]	0.013	0.01; 0.002	<0.001
Random effects			
Interindividual standard deviation	0.99	0.77; 1.27	
Intraindividual standard deviation			
Control	1.01	0.88; 1.16	<0.001[a]
Sepsis	0.91	0.8; 1.03	
NE infusion	0.38	0.33; 0.43	
NE+Sepsis	0.62	0.55 ; 0.7	

[a]Interaction MAP × threshold 100 mmHg.
[b]For between-groups comparison.
[c]Interaction MAP × NE infusion.
MAP: mean arterial pressure; NE: norepinephrine.

of interaction between MAP and 100 mmHg threshold on RBF), whereas when MAP was <100 mmHG, increasing blood pressure by 1 mmHg increased RBF by 0.05 mL/min (single effect of arterial pressure on RBF; the effect of interaction is by design equal to zero as MAP >100). Of note, this threshold was chosen *a priori* as it is considered as the usual 'autoregulation' threshold of the relationship between MAP and RBF in rats [15]. NE infusion significantly decreased RBF, irrespective of septic status and MAP measurement (no interaction between NE and MAP and between NE and Sepsis was detected). Sepsis had no significant impact on RBF. Intra-animal RBF variability differed significantly among the different groups. Sepsis and NE decreased variability, which was lowest in Sepsis+NE animals. In other words, in the presence of NE and sepsis, the change in RBF in a given animal was more predictable using the fixed effects included in the model (particularly the MAP variation) than in the absence of these events.

Regarding CBF, MAP significantly increased CBF, regardless of septic status. The MAP-dependent increase in CBF varied according to the 100 mmHg MAP threshold and NE infusion. When MAP was >100 mmHg, the increase in CBF was greater (as opposed to that observed for RBF) in response to a rise in MAP than when MAP was <100 mmHg (positive interaction between the MAP effect and the 100 mmHg threshold effect). The increase in CBF in response to an increase in MAP was lower than when rats were perfused with NE (negative interaction between the MAP effect and the NE infusion effect). However, when rats were perfused with NE, CBF was increased regardless of septic status and MAP measurement. CBF was also increased in presence of sepsis, regardless of NE infusion status and MAP measurement. Intra-animal CBF variability was reduced in the presence of NE and to a lower extent in Sepsis+NE animals.

Beyond the analysis of the interaction between the 100 mmHg threshold and MAP, we compared the variations in RBF and CBF when MAP was decreased from 130 mmHg to 100 mmHg among the different groups (Table 2). No significant difference in RBF variations was observed between control, Sepsis, NE, and Sepsis+NE groups when MAP was lowered to this level. This observation could indicate that the slope of the MAP/RBF relationship may be similar across all groups in this range of MAP. In contrast, CBF variations seemingly differed among the various groups in that the decrease in CBF appeared to be lower in the presence of NE infusion.

Table 2 Variation in renal and carotid blood flow for a 130-to-100 mmHg mean arterial pressure drop.

	Δ Renal blood flow		Δ Carotid blood flow	
	Value (mL/min)	*P*	Value (mL/min)	*P*
Control	-0.66 ± 1.35	0.92	-1.53 ± 1.20	<0.01
Sepsis	-0.59 ± 0.93		-1.60 ± 1.35	
NE infusion	-0.45 ± 0.70		-0.54 ± 0.38	
NE+Sepsis	-0.70 ± 0.55		-0.68 ± 0.52	

NE: norepinephrine.

Renal cortical peritubular microcirculation

Figure 3 shows Vm profiles according to measured MAP (numerical data provided in Additional file 2, Table S1) while Table 3 summarizes the linear mixed model for Vm. A significant positive relationship was observed between MAP and Vm. Moreover, NE infusion decreased blood velocity whereas sepsis enhanced this parameter. No interaction was detected between these different effects, that is, the effects described above were observed regardless of the other tested parameters. Intra-animal variability for Vm was significantly different between groups, being lower in Sepsis. Of note, when RBF was considered in lieu of MAP in a linear mixed model, similar fixed and random effects were observed (data not shown) such that for a given RBF, Vm was reduced by NE while enhanced by sepsis.

Renal function

Serum creatinine measurements performed at the end of the experiments were significantly different among the different groups, notably sepsis induced an increase in serum creatinine, which was prevented in the presence of NE (CT 37 ± 2, CT+NE 40 ± 6, Sepsis 68 ± 12, Sepsis+NE 41 ± 4 μmol/L, $P = 0.0001$).

Discussion

The present animal study was aimed at delineating the 'macro' and 'micro' hemodynamic changes over a broad range of mean arterial pressures in septic condition with or without NE infusion. The original design of our study with controlled variations in MAP allowed entering MAP, NE and sepsis as independent variables and assess RBF or CBFand cortical peritubular capillary blood velocity as dependent variables. Mixed models are particularly suitable for repeated measures and for modeling correlations between measurements and were hence used in the present setting. As sepsis is characterized by altered variability of clinical and biological signals, assessing variability of measurements was considered [16,17]. Consequently, we paid special attention to display all collected data in figures.

As expected, positive correlations were found between MAP and RBF as well as between MAP and CBF: namely, the higher the MAP, the higher the blood flow in these vessels. Sepsis did not appear to have an independent impact on RBF; conversely, NE decreased RBF. Indeed, in the present model, for any given MAP, RBF

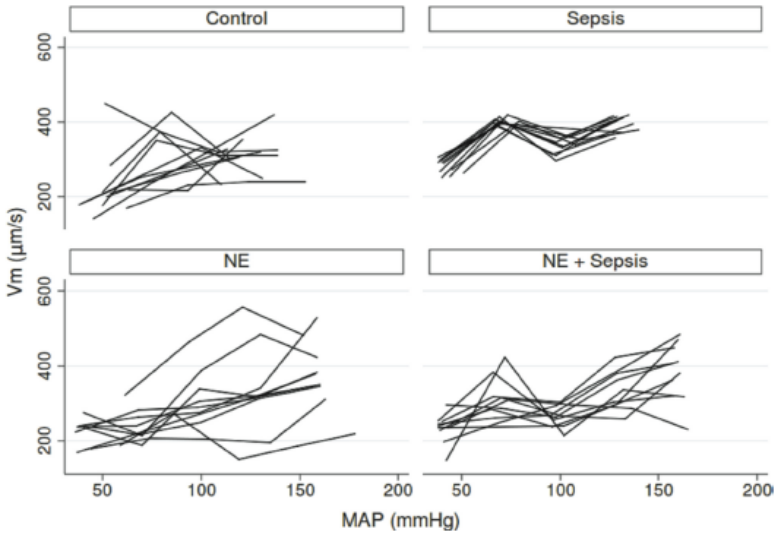


Figure 3 Vm according to MAP in the different experimental groups. Only the first of the three sets of measurements for each MAP step are shown. However, the statistical analyses presented in the article take into account all of the measurements. MAP: mean arterial pressure; Vm: microcirculatory velocity.

remained similar in the presence or absence of sepsis, but was lower in the presence of NE, thus providing evidence that NE displays a renal vasoconstrictive effect in this rat model. Of further importance, the relationship between MAP and RBF was weaker at MAP levels >100 mmHg in comparison to <100 mmHg. This is in accordance with an autoregulation phenomenon, although we did not observe a true RBF 'plateau'. More specifically, the variation in RBF when MAP varied from 100 to 130 mmHg did not differ in the presence or absence of sepsis or of NE, which may argue for the existence of this autoregulation phenomenon irrespective of the presence of sepsis or NE. Some of the observations pertaining to the kidney were organ specific since sepsis, NE and the MAP 100 mmHg threshold impacted CBF differently: both sepsis and NE increased CBF while the relationship between MAP and CBF was increased above 100 mmHg. Finally, a positive relationship was observed between MAP and renal cortical peritubular blood velocity (Vm) in that the higher the MAP, the higher the Vm. For a given MAP, sepsis increased Vm while NE decreased this velocity, such that NE tended to 'antagonize' the effect of sepsis on Vm. Finally, sepsis was associated with an increase in serum creatinine, which was prevented by NE.

Table 3 Linear mixed model for microcirculatory velocity (Vm) in peritubular cortical capillaries.

Vm	Coefficient	95% confidence interval	*P*
Fixed effects			
MAP (mmHg)	1.08	0.94; 1.23	<0.001
NE infusion	-77.3	-96.6; -58	<0.001
Presence of sepsis	48.1	22.4; 73.7	<0.001
Random effects			
Interindividual standard deviation	39.9	30.1; 52.8	
Intraindividual standard deviation			
Control	57.5	49.4; 66.9	<0.001[a]
Sepsis	49.8	43.4; 57.2	
NE infusion	53.9	47.3; 61.4	
NE+Sepsis	59.7	52.9; 67.4	

[a]For between groups comparison.
MAP: mean arterial pressure; NE: norepinephrine.

RBF in sepsis has long been a subject of debate given that some models displayed decreased RBF while others showed either normal or elevated RBF. Langenberg et al. reconciled these conflicting data by demonstrating that the main parameter that predicted RBF in the various published animal models was the maintenance of cardiac output through fluid loading [2]. Herein, we confirm these findings, as previously observed, after restoring normal MAP through fluid loading, RBF did not differ in the presence/absence of sepsis. Furthermore, we extend these data by showing that the relationship between MAP and RBF is not altered and that the relative RBF 'plateau' observed above a MAP of 100 mmHg, usually referred to as 'autoregulation' phenomenon, appeared to be preserved in sepsis or in the case of NE infusion [15]. This last observation deserves to be emphasized since 'autoregulation' alteration is frequently

cited as a contributing factor to renal failure [18]. The ability of the kidney to maintain RBF when MAP varies over a certain range is enabled both by the myogenic reflex and the tubuloglomerular feedback and is impacted by neuroendocrine kidney vasomotor regulation [19]. These effectors are dependent upon the integrity of several renal structures (that is, vascular, tubular) working in cooperation. It should be acknowledged that we only assessed the ensuing few hours after induction of sepsis, likely before renal damage may have sufficiently evolved to alter these structures. Indeed, several experimental data have shown that renal hemodynamics may be totally different at the initiation, maintenance, and recovery phases of AKI [16,20].

Cardiac output was not monitored in the present study. Inserting a Doppler probe around the thoracic aorta is very invasive in rats and we felt it would have added an unwanted form of insult to our rat model. Indeed, our model is very complex and sensitive to any supplemental form of aggression, especially in septic animals, and thus we had to carefully put into balance the relevance of any additional procedure and the risk that such procedure may destabilize the entire model. It should also be emphasized that the present study was essentially 'kidney centered' with the main objective to assess the existence or not of an autoregulation phenomenon, which is evaluated by the relationship between MAP and RBF. Thus, we chose to monitor RBF at 'controlled' levels of MAP, and not cardiac output, in order to provide a direct evaluation of this relationship. We believe that not measuring cardiac output could have been a problem in interpreting RBF had we observed a reduced RBF. Conversely, the absence of impact of sepsis on RBF indirectly indicates that cardiac output was not compromised, at least significantly, in our resuscitated model. In fact, absence of cardiac output measurements prevented us from determining whether renal and/or systemic resistances varied in a similar manner or not, that is, whether renal behavior is different from other vascular beds. A partial response to this answer was to monitor carotid blood flow, which is easy to access. Indeed, we observed that RBF and CBF did not vary identically.

Deciphering the direct renal effect of NE infusion has been especially difficult as this drug also impacts systemic hemodynamics, which in turn modifies renal circulation [18]. Indeed, most models showed that NE infusion was associated with an increased RBF together with an increased MAP and cardiac output [21]. The particular design of our study allowed to 'offset' the systemic effect of NE and to observe a direct vasoconstrictive effect of NE on renal vasculature. Influence of sepsis on the effect of NE on RBF adds another level of complexity to the already discrepant results reported in the literature. Some authors evidenced that the increase in RBF after NE infusion in septic animals was not completely explained by an increase in perfusion pressure indicating that, in this condition, NE may actually decrease renal vascular resistance [22]. Other studies showed a preservation of the pressor response to norepinephrine in the kidney, albeit with a diminished response in other vascular beds [5]. In the present study, we did not observe any modification of the renal response to NE incurred by sepsis. However, we should acknowledge the limitation of our model due to sample size, such that a small impact of sepsis on the effect of NE on renal vasculature cannot be ruled out.

Few data have been published to date on renal microcirculation changes in sepsis. To our knowledge, no report has used SDF imaging to assess kidney microcirculation until now. We observed that this technique allows an easy and direct observation of blood cell velocities in peritubular capillaries. In capillaries (blood vessel diameter <10 μm), blood cell velocity can be considered as blood velocity, such that we believe the parameter measured herein is a relevant index of renal cortical microperfusion [13]. It was observed that sepsis induces cortical peritubular blood cell hypervelocity, which was corrected by NE. Also noteworthy is that sepsis seems to impact cortical peritubular microcirculation and RBF differently in sepsis. Studies using intravital microscopy have previously been conducted on non-reanimated mice and rats by the group of Mayeux et al. [7,8,23]. These experiments showed a rapid decrease in the proportion of peritubular capillaries with continuous flow after induction of sepsis, which we did not observe in this study (data not shown). However, absence of fluid loading following sepsis induction in these particular experiments is likely to have resulted in a drastic drop in MAP, cardiac output, and RBF. Several publications have described the variation in cortical and subcortical oxygenation in septic condition in reanimated small animals using dual-wavelength oxygen phosphorimetry [6,24,25]. In these models, cortical oxygenation parameters were altered in septic animals and were only partially corrected by volume expansion allowing the normalization of RBF [24]. However, using oxygenation as a proxy for microcirculation may be debatable. Indeed, a recent study reported normal kidney oxygenation measured by blood oxygen level-dependent MRI in LPS-treated mice despite diminished RBF [26]. In this latter study, the authors evidenced profound mitochondrial alterations in the septic kidney, which could result in impaired oxygen utilization, such that oxygen tension may not be a good indicator of microvascular perfusion in sepsis.

Unfortunately, our findings do not allow to pinpoint the precise implications regarding acute kidney injury of

peritubular capillary hypervelocity induced by sepsis and its correction by NE. Endothelial microvascular lesions have emerged as a component of kidney injury in several models, including sepsis or ischemia-reperfusion [4,27,28]. Peritubular capillary alterations have been the parameter most closely associated with renal failure among all vascular abnormalities described [28]. Peritubular capillaries immediately follow glomerular circulation, which determines the filtration capacity of the kidney. One hypothesis could be that sepsis elicits a diminished vascular tone of the glomerulus efferent artery resulting in both a hypervelocity in the ensuing capillaries and a drop in glomerular filtration pressure. NE may correct this vascular tone thus restoring normal capillary velocity and filtration pressure. To date, however, exploring glomerular circulation to confirm this hypothesis *in vivo* has been beyond the reach of current technical capabilities. Of note, whether velocity of blood cells is an accurate index of blood flow is difficult to establish. In addition to velocity, the diameter of blood vessels and the number of blood vessels perfused should be taken into account. Although we did not observe variations in capillary sizes (that is, no vascular ectasia) or the appearance of non-perfused vessels (data not shown), the precision of these latter observations do not allow us to extrapolate accurate blood flow measurements from our dataset. Only cortical peritubular capillaries were evaluated, while deep cortical and medullary circulations were not assessed. Given the complexity of the renal architecture corresponding to different vascular organizations, it should be acknowledged that our experiments only target a very limited spectrum of the entire span of renal capillaries. Finally, variabilities in RBF and Vm measurements were lowered by sepsis, such as the model better predicted individual values for a given MAP. This is in keeping with previous observations of a loss of spontaneous heart rate variability in patients with multiple organ dysfunction or sepsis [17]. A blunted autonomic function has been hypothesized in sepsis to explain these data, however the relevance of this altered variability for organ dysfunction remains unknown.

Several limitations of our study have already been discussed above. Notably, in this 'kidney-centered' study, parameters (including cardiac output, renal venous pressure, renal interstitial pressure, inflammation parameters, and so on) with potential interest in deciphering the relationship observed between MAP and RBF could not be measured. However, this study is nonetheless relevant with regard to one of the more prevailing questions in clinical practice for patients in shock conditions, namely the MAP target that should be reached through fluid loading and NE. We were not able to measure renal filtration during our MAP steps due to limited time spent at each step. Our evaluation of renal function with serum creatinine at the end of the experiments represents the sum of all insults that occurred to the kidney throughout each experiment. It is thus impossible to discriminate precisely at which time point changes in glomerular filtration occurred and eventually became permanent, which limits what can be inferred from creatinine measurements. At least, the observation that sepsis led to increased serum creatinine confirms the relevance of our model.

Conclusions

Our resuscitated rat model adds to the knowledge on renal macro-hemodynamics in sepsis in that the ability of the kidney to protect itself by maintaining RBF when MAP varies above a certain MAP threshold does not appear to be altered by the presence of sepsis or NE infusion. Notwithstanding, a direct vasoconstrictive effect of NE was evidenced. In contrast with the absence of any observable effect of sepsis on the relationship between MAP and RBF in resuscitated animals, from a microcirculatory standpoint, sepsis is very rapidly associated with 'hypervelocity' of blood flow in cortical peritubular capillaries, which is reversed by NE infusion. The mechanisms and consequences of this discrepant effect of sepsis on renal macro and microcirculations may be of great importance in understanding the failure of glomerular function in sepsis.

Key messages

- In a rat model, early sepsis does not modify the relationship between renal blood flow and mean arterial pressure.
- Conversely, a vasoconstrictive effect of norepinephrine was observed.
- Sidestream Dark Field imaging enabled to observe blood hypervelocity in cortical peritubular capillaries in sepsis, which was improved by norepinephrine
- Thus, sepsis appears to differently impact kidney macro- and microcirculations

Additional material

Additional file 1: Video S1 (online). Video sequences of the kidney surface obtained with a Sidestream Dark Field (SDF) camera. After image stabilization and averaging, displacement of blood cells in cortical peritubular capillaries can be observed. Artifacts created by displacement of white blood cells among red blood cells can be readily observed and measured.

Additional file 2:

Abbreviations

AKI: acute kidney injury; CBF: carotid blood flow; CT group: control group; CT +NE group: control + norepinephrine group; GFR: glomerular filtration rate;

HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; NE: norepinephrine; RBF: renal blood flow; Sepsis+NE group: sepsis + norepinephrine group; SDF: Sidestream Dark Field; Vm : cortical microcirculatory velocity.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
MB participated in the design of the study, acquired the data, and drafted the manuscript; JFH participated in the design of the study and performed the statistical analysis; MT participated in the design of the study, acquired the data, and drafted the manuscript; MdB participated in the design of the study, acquired the data, and drafted the manuscript; AD participated in the design of the study, acquired the data, and drafted the manuscript; AM interpreted the data and drafted the manuscript; PC and AM interpreted the data and drafted the manuscript; PA and NL conceived and designed the study, interpreted the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements
The authors wish to thank Pierre Legras and Jérome Roux for animal care. This study was made possible by an unrestricted grant from the Association de Recherche en Réanimation Médicale et Médecine Hyperbare, Département de Réanimation Médicale et de Médecine Hyperbare, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 49933 Angers, France.

Authors' details
[1]Laboratoire HIFIH, UPRES EA 3859, PRES l'UNAM, IFR 132, Université Angers, 49000 Angers, France. [2]Centre de recherche clinique, Centre hospitalier Universitaire Angers, 49933 Angers, France. [3]Département de Réanimation Médicale et de Médecine Hyperbare, Centre Hospitalier Universitaire Angers, 49933 Angers, France. [4]CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France.

Received: 28 February 2013 Revised: 16 May 2013
Accepted: 12 July 2013 Published: 12 July 2013

References
1. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C: **Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study.** *JAMA* 2005, **294**:813-818.
2. Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, Morgera S: **Renal blood flow in sepsis.** *Crit Care* 2005, **9**:R363-374.
3. Payen D, Lukaszewicz A-C, Legrand M, Gayat E, Faivre V, Megarbane B, Azoulay E, Fieux F, Charron D, Loiseau P, Busson M: **A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e35838.
4. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA: **Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure.** *Kidney Int* 2002, **62**:1539-1549.
5. Boffa J-J, Arendshorst WJ: **Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**:117-124.
6. Johannes T, Mik EG, Nohé B, Raat NJH, Unertl KE, Ince C: **Influence of fluid resuscitation on renal microvascular PO2 in a normotensive rat model of endotoxemia.** *Crit Care* 2006, **10**:R88.
7. Wu L, Gokden N, Mayeux PR: **Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury.** *J Am Soc Nephrol* 2007, **18**:1807-1815.
8. Tiwari MM, Brock RW, Megyesi JK, Kaushal GP, Mayeux PR: **Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**: F1324-1332.
9. Badin J, Boulain T, Ehrmann S, Skarzynski M, Bretagnol A, Buret J, Benzekri-Lefevre D, Mercier E, Runge I, Garot D, Mathonnet A, Dequin P-F, Perrotin D: **Relation between mean arterial pressure and renal function in the early phase of shock: a prospective, explorative cohort study.** *Crit Care* 2011, **15**:R135.
10. De Backer D, Ortiz JA, Salgado D: **Coupling microcirculation to systemic hemodynamics.** *Curr Opin Crit Care* 2010, **16**:250-254.
11. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, Brasseur A, Defrance P, Gottignies P, Vincent J-L: **Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock.** *N Engl J Med* 2010, **362**:779-789.
12. Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C: **Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation.** *Opt Express* 2007, **15**:15101-15114.
13. Mairey E, Genovesio A, Donnadieu E, Bernard C, Jaubert F, Pinard E, Seylaz J, Olivo-Marin J-C, Nassif X, Duménil G: **Cerebral microcirculation shear stress levels determine Neisseria meningitidis attachment sites along the blood-brain barrier.** *J Exp Med* 2006, **203**:1939-1950.
14. Laird NM, Ware JH: **Random-effects models for longitudinal data.** *Biometrics* 1982, **38**:963-974.
15. Adams PL, Adams FF, Bell PD, Navar LG: **Impaired renal blood flow autoregulation in ischemic acute renal failure.** *Kidney Int* 1980, **18**:68-76.
16. Benes J, Chvojka J, Sykora R, Radej J, Krouzecky A, Novak I, Matejovic M: **Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study.** *Crit Care* 2011, **15**:R256.
17. Korach M, Sharshar T, Jarrin I, Fouillot JP, Raphaël JC, Gajdos P, Annane D: **Cardiac variability in critically ill adults: influence of sepsis.** *Crit Care Med* 2001, **29**:1380-1385.
18. Bellomo R, Giantomasso DD: **Noradrenaline and the kidney: friends or foes?** *Crit Care* 2001, **5**:294-298.
19. Just A, Wittmann U, Ehmke H, Kirchheim HR: **Autoregulation of renal blood flow in the conscious dog and the contribution of the tubuloglomerular feedback.** *J Physiol (Lond)* 1998, **506(Pt 1)**:275-290.
20. Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R: **Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury.** *Intensive Care Med* 2007, **33**:1614-1618.
21. Di Giantomasso D, Morimatsu H, May CN, Bellomo R: **Intrarenal blood flow distribution in hyperdynamic septic shock: Effect of norepinephrine.** *Crit Care Med* 2003, **31**:2509-2513.
22. Bellomo R, Kellum JA, Wisniewski SR, Pinsky MR: **Effects of norepinephrine on the renal vasculature in normal and endotoxemic dogs.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159(4 Pt 1)**:1186-1192.
23. Seely KA, Holthoff JH, Burns ST, Wang Z, Thakali KM, Gokden N, Rhee SW, Mayeux PR: **Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2011, **301**:F209-217.
24. Legrand M, Bezemer R, Kandil A, Demirci C, Payen D, Ince C: **The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats.** *Intensive Care Med* 2011, **37**:1534-1542.
25. Johannes T, Mik EG, Ince C: **Dual-wavelength phosphorimetry for determination of cortical and subcortical microvascular oxygenation in rat kidney.** *J Appl Physiol* 2006, **100**:1301-1310.
26. Tran M, Tam D, Bardia A, Bhasin M, Rowe GC, Kher A, Zsengeller ZK, Akhavan-Sharif MR, Khankin EV, Saintgeniez M, David S, Burstein D, Karumanchi SA, Stillman IE, Arany Z, Parikh SM: **PGC-1α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice.** *J Clin Invest* 2011, **121**:4003-4014.
27. Kwon O, Phillips CL, Molitoris BA: **Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, **282**:F1012-1019.
28. Kwon O, Hong S-M, Sutton TA, Temm CJ: **Preservation of peritubular capillary endothelial integrity and increasing pericytes may be critical to recovery from postischemic acute kidney injury.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, **295**:F351-359.

doi:10.1186/cc12818
Cite this article as: Burban *et al.*: Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats. *Critical Care* 2013 **17**:R139.

6. CONCLUSION

Notre modèle montre que, d'un point de vue hémodynamique macrocirculatoire, lors de la phase précoce, le sepsis n'a pas d'impact particulier sur le rein comme le montre le débit artériel rénal qui varie en réponse aux variations de pression artérielle moyenne, incluant le phénomène « d'autorégulation ». L'effet vasoconstricteur de la noradrénaline ne semble pas avoir d'impact sur la fonction rénale, du moins sur le court terme. Néanmoins, d'un point de vue microcirculatoire, le sepsis est associé très rapidement à une « hypervitesse » du flux sanguin dans les capillaires corticaux péritubulaires et une dysfonction rénale limitée par la perfusion de noradrénaline. Dans notre modèle, l'administration de NE chez les rats septiques a normalisé la vitesse de circulation dans la microcirculation et a aussi pu améliorer le shunt microcirculatoire (cf. Figure 26). Ce phénomène de shunt au niveau microcirculatoire par un "Off loading" de l'hémoglobine pourrait expliquer en partie les mécanismes de l'insuffisance rénale qui survient chez les patients septiques en dépit d'une réanimation hémodynamique adéquate.

Dans cette étude, l'adaptation naturelle du rein par le phénomène « d'autorégulation » a permis à cet organe de résister en partie à l'effet d'I/R dû au choc septique. Dans un autre cas d'I/R par choc hémorragique, l'H_2S, une molécule endogène produite dans le rein, pourrait contribuer à la défense naturelle de l'organe contre les perturbations hémodynamiques induites comme dans le cas de l'autorégulation rénale.

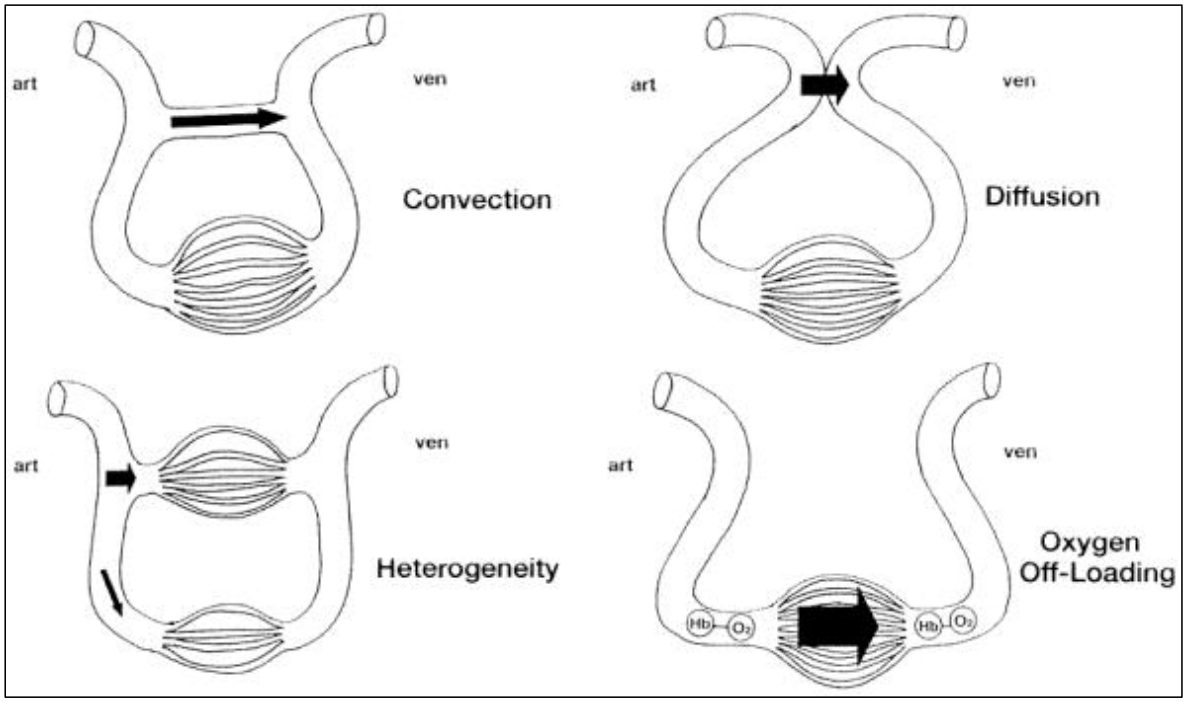


Figure 26: Mécanisme microcirculatoire de l'affection du transport d'oxygène : le shunt fonctionnel (Ince et al., 1999).

ETUDE 2 :

Etude des effets du sulfure d'hydrogène sur l'hémodynamique et la fonction rénale au cours du choc hémorragique réanimé chez les rats.

1. L'HYDROGENE SULFURE

1.1. Définition et Historique

L'hydrogène sulfuré ou sulfure d'hydrogène (H_2S) est le troisième gazotransmetteur décrit après le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO). H_2S est un gaz incolore, inflammable, avec une odeur caractéristique « d'œuf pourri ». Il est soluble dans l'eau et dans certains solvants organiques (Clavel *et al.,* 1997). L'hydrogène sulfuré a longtemps été considéré comme une substance toxique. Pour des teneurs élevées, l'inhalation de ce gaz est susceptible de provoquer des intoxications aiguës qui peuvent être graves, voire mortelles avec les plus fortes concentrations. H_2S est notamment présent dans le charbon, le pétrole et le gaz naturel et se forme par fermentation anaérobie de substances organiques diverses (plantes, algues, égouts, silos…) (Yalamanchili *et al.* 2008). Il peut également être émis lors de réactions chimiques sur des composés soufrés comme l'hydrosulfure de sodium (NaHS). Il existe également une production endogène d'H_2S, liée au catabolisme de la cystéine et de la méthionine (Szabo, 2007) (cf. Figure 27). Les fonctions physiologiques d'H_2S endogène ne sont pas bien connues. Plusieurs études expérimentales se sont focalisées sur les effets des donneurs et des inhibiteurs de H_2S dans différents modèles animaux (choc hémorragique, ischémie/reperfusion, endotoxémie et sepsis d'origine bactérienne) afin de préciser le mode d'action de H_2S qui est maintenant classé parmi les neuromessagers atypiques (Baranano *et al.* 2001).

1.2. Synthèse, régulation et Catabolisme

La production biologique de H_2S a été d'abord étudiée chez les bactéries et les algues, mais ce n'est que depuis 1989 que sa production endogène chez l'homme et les mammifères a été mise en évidence, en particulier dans les structures cérébrales (Warenycia et al. 1989). La biosynthèse endogène de l'H_2S dans les tissus des mammifères, notamment dans le cerveau, le foie et les reins, implique des voies enzymatiques et non enzymatiques. La voie de synthèse enzymatique via les enzymes spécifiques au métabolisme de H_2S, la cystathionine ß-synthase (CBS) et la cystathionine ɣ-lyase (CSE), constitue la principale voie dans les différents tissus (cf. Figure 27). L'expression de CBS et CSE est spécifique de certains tissus. CBS est

l'enzyme de génération de l'H_2S prédominant au niveau du cerveau, du système nerveux, du foie et des reins, alors que CSE est davantage exprimée au niveau du foie et des cellules musculaires lisses péri-vasculaires (Doeller *et al*. 2005). Au niveau du cytosol, CBS catalyse la production de cystathionine par condensation de l'homocystéine, produit intermédiaire de déméthylation de la méthionine, avec une molécule de sérine. La cystathionine est ensuite convertie en cystéine par l'action de la CSE. La cystéine, qui pourrait aussi être libérée à partir des protéines endogènes, est ensuite convertie en ammonium, pyruvate et H_2S via l'action de l'une des deux enzymes CBS ou CSE. Récemment, une autre voie enzymatique de biosynthèse de H_2S au niveau du cerveau et de l'endothélium vasculaire de l'aorte thoracique a été décrite par l'équipe de Kimura (Shibuya et al. 2009a ; Shibuya et al. 2009b). Dans cette voie, l'aspartate aminotransférase (AAT) catalyse la formation de 3-mercaptopyruvate à partir de la cystéine, à la fois au niveau cytosolique et mitochondrial. Ensuite le 3-mercaptopyruvate *via* l'action de la 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST ou MST), conduit à la libération de H_2S (Kajimura et al. 2010). Une synthèse non enzymatique est également possible, mais celle-ci reste relativement peu importante (Gadalla *et al.* 2010, Wang *et al.* 2002). Cette production de H_2S dans les cellules peut être modulée par les gazotransmetteurs. Zhao et al. ont montré sur des cellules isolées de muscles lisses de rat, une augmentation de l'expression de l'activité de CSE en présence de donneur de NO et par conséquence une augmentation de la production de H_2S (Zhao et al. 2001). Paradoxalement, le NO semble induire une diminution de l'activité de l'enzyme CBS (Miles *et al*. 2004). Le CO peut également induire une inhibition de l'activité enzymatique de CBS en formant des liaisons avec cette enzyme d'une affinité plus forte que celle du NO (Taoka and Banerjee, 2001). En outre, l'activité enzymatique de CBS et CSE semble être contrôlée négativement par le H_2S lui-même.

Entre autres formes, H_2S peut être obtenu à partir de NaHS, l'hydrosulfure de sodium. Il s'agit de la forme utilisée dans notre étude. A partir d'une forme anhydre et de soluté salé isotonique, nous avons reconstitué NaHS. Le sulfure d'hydrogène, H_2S est donc généré par dissociation spontanée d'un donneur de H_2S (Koenitzer *et al.* 2007), dans une solution aqueuse selon les équations suivantes:

$$NaHS \rightarrow Na^+ + HS^-$$

$$2HS^- \leftrightarrow H_2S + S^{2-}$$

$$HS^- + H^+ \leftrightarrow H_2S$$

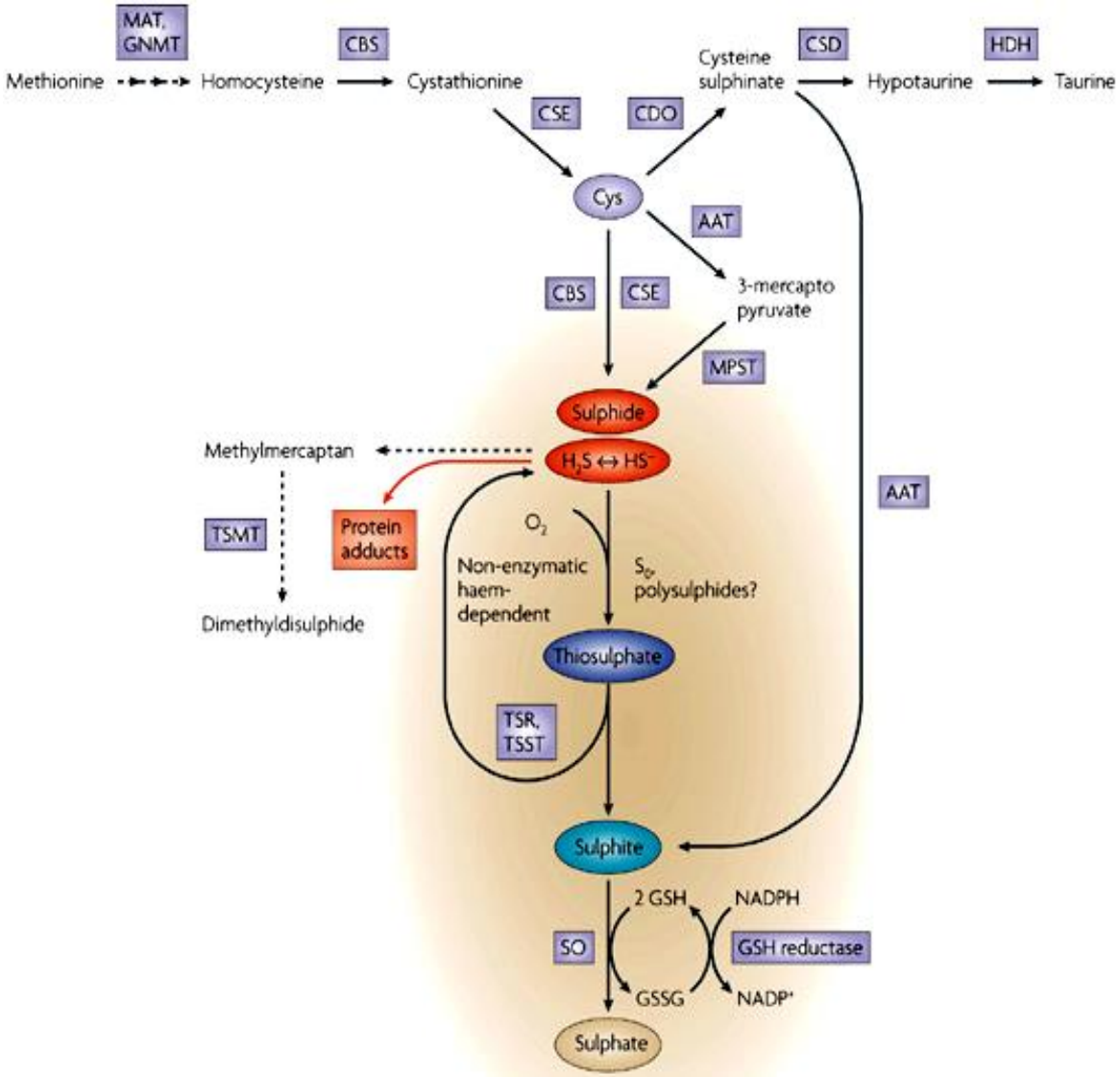


Figure 27: Production endogène et métabolisme de H2S
(Szabo, 2007)

Dérivée des sources alimentaires, la méthionine est convertie en S-adenosylmethionine par la methionine adenosyltransferase (MAT). La S-adenosylmethionine est ensuite hydrolysée en homocysteine par la glycine N-methyltransferase (GNMT). La Cystathionine-β-synthase (CBS) catalyse la production de cystathionine en transformant la molécule d'homocystéine. La Cystathionine-γ-lyase (CSE) convertit la cystathionine en cystéine (Cys). L'hydrogène sulfuré (H2S) est ensuite former par la CSE ou la CBS. Dans la mitochondrie, la cystéine pourrait être convertie en 3-mercaptopyruvate par l'aspartate aminotransferase (AAT), puis va être convertie en H2S par la 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase (MPST).
Une voie de métabolisme de la cystéine implique son oxydation en cystéine sulphinate par la cystéine désoxygénasse (CDO), qui va être convertie en hypotaurine par la cystéine sulphinate décarboxylase (CSD), et finalement en taurine par une réaction non enzymatique ou par l'hypotaurine déshydrogénase (HDH).
Le Sulphide, via des réactions non enzymatiques, est métabolisé en thiosulphate, qui va être ensuite converti en sulphite par la thiosulphate reductase (TSR), dans les tissus hépatique, rénal ou cérébral, ou par la thiosulphate sulphurtransferase (TSST), qui est majoritairement exprimée dans le foie. Le sulphite est aussi produit à partir de la cystéine sulphinate par l'AAT. Le Sulphite est ensuite oxydé en sulfate par la sulphite oxydase (SO) par un processus glutathion (GSH)-dépendent.

Comme les autres gasotransmetteurs, H_2S traverse librement les membranes cellulaires, sans transporteur spécifique. Dans l'organisme, sa demi-vie est très courte, de l'ordre de 15 minutes. Il existe trois voies de dégradation d'H_2S : la principale voie est l'oxydation mitochondriale. L'H_2S est rapidement oxydé en thiosulfate. Une thiosulfate cyanide sulfure-transférase catalyse la conversion du thiosulfate en sulfite et/ou sulfate. La deuxième voie est la méthylation cytosolique. L'H_2S peut également être méthylé en méthanethiol et diméthyl sulfure par la thiol-S-méthyltransférase dans le cytosol, puis l'élimination hépatique. La troisième voie est responsable en partie de sa toxicité puisqu'H_2S est capable de se fixer aux protéines et notamment à l'hémoglobine et former la sulfhémoglobine (Caliendo *et al.* 2010). Ses cibles d'action et ses effets sont très variés (cf. Figure 28). En effet, H_2S a de nombreuses propriétés (Lowicka *et al.* 2007, Szabo 2007) dans des champs d'action assez diversifiés, plus généralement au niveau cellulaire dans l'inflammation et l'apoptose (Baskar *et al.* 2006).

1.3. Effets physiologiques de H_2S

L'utilisation d'inhibiteurs endogènes de H_2S tels que l'hydroxylamine (HA), un inhibiteur de la CBS ou le DL-propargylglycine (PAG), un inhibiteur de la CSE, ou encore l'application de précurseurs ou de donneurs de H_2S tel que le NaHS, ont permis de découvrir de nombreux effets biologiques cellulaire et tissulaires de H_2S.

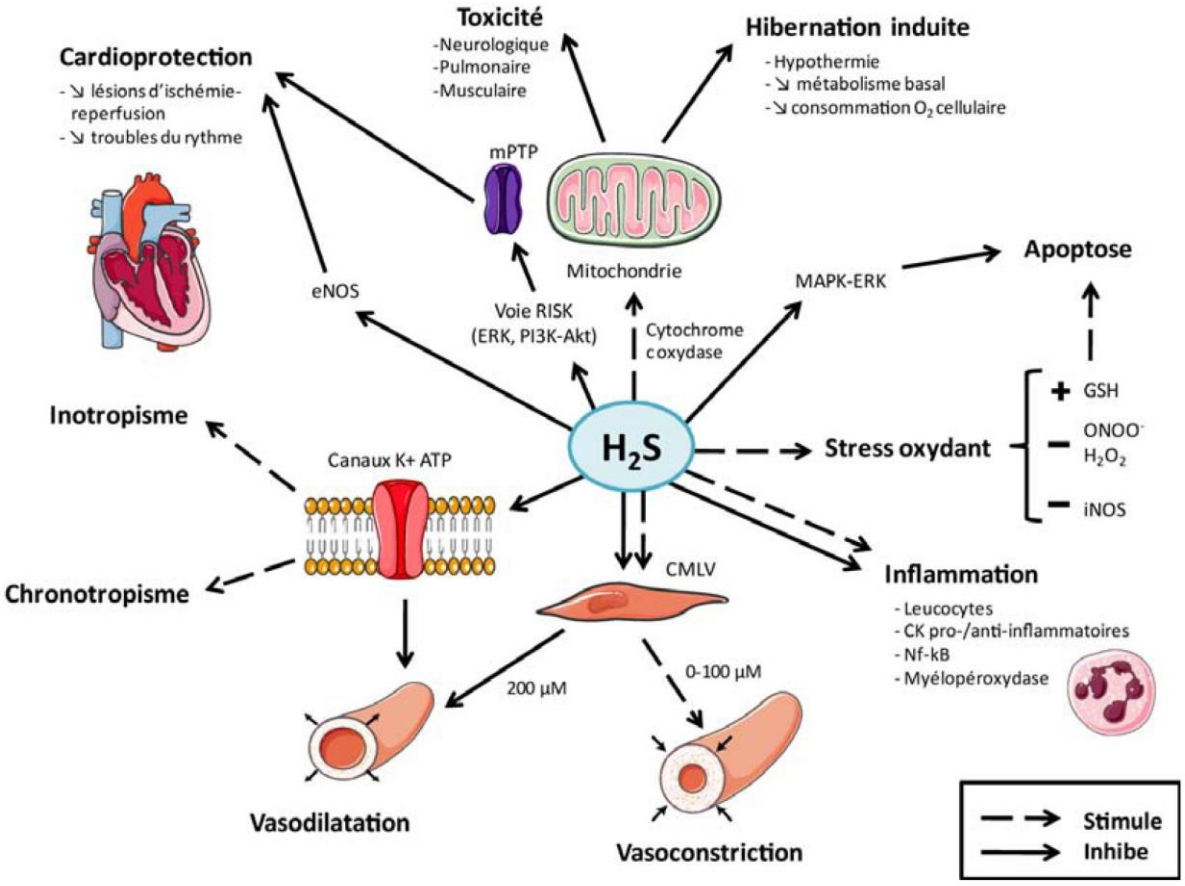


Figure 28: Effets de H2S dans l'inflammation, le stress oxydant, l'apoptose et les fonctions cardiovasculaires
(Boisramé-Helms *et al.* 2012)

(CK : cytokine ; CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire ; eNOS : NO synthase endothéliale ; ERK : *extracellular signal-regulated kinases* ; GSH : glutathion réduit ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; H_2S : hydrogène sulfuré ; iNOS : NO synthase inductible ; MAPK : *mitogen-activated protein kinase* ; mPTP : *mitochondrial permeability transition pore* ; NF-κB *: nuclear factor kappa B* ; $ONOO^-$: peroxynitrite ; PI3K : phospho-inositol 3 kinase ; RISK : *reperfusion injury salvage kinase*).

1.3.1. Rôle de H_2S dans l'hypométabolisme induit

Parmi ses nombreuses propriétés, H_2S entraîne une inhibition réversible de la phosphorylation oxydative au niveau du complexe IV (cytochrome c oxydase) de la chaîne mitochondriale, entraînant une diminution de la production énergétique (Mayes 1989, Nouette *et al.*, 2007). L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par H_2S entraîne la réduction de la consommation cellulaire d'oxygène et participe à la diminution de la taille de la zone infarcie par diminution des ROS et augmentation de l'activité du complexe I et du complexe II de la chaîne respiratoire. Les effets réversibles d'H_2S sur la chaîne

mitochondriale chez le rat ont été démontrés in vivo et in vitro chez le rat par l'équipe de Khan en 1990 (Khan *et al.*, 1990). En effet, en inhibant de façon réversible le cytochrome C oxydase du complexe IV, H_2S bloque la chaîne respiratoire et la production d'ATP (Dorman *et al*. 2002, Khan *et al.* 1990). Par cette voie, H_2S induit un hypométabolisme cellulaire et peut provoquer, selon les concentrations, un état d'hibernation réversible. L'état d'hypométabolisme se manifeste par une hypothermie suite à une diminution de la consommation énergétique. Au cours des états de choc, cette diminution de métabolisme permet de réduire le déséquilibre entre l'apport et la consommation d'oxygène et ainsi de préserver les tissus des lésions hypoxiques (Polderman *et al.* 2008). Initialement, cette effet a été mis en évidence chez les espères inférieures, notamment chez les nématodes (Padilla *et al.* 2001, Nystul *et al.* 2004). La diminution de la consommation et de la production d'énergie associée à cet état, permettrait également à des espèces non hibernantes de survivre à des contraintes extrêmes comme les changements de température ou de la privation d'oxygène. Ensuite, l'état d'hypométabolisme (*suspended animation*) induit par H_2S a été démontré chez les souris associé à une dépression respiratoire, une bradycardie, une hypothermie et une baisse de la consommation d'oxygène sans baisse de la pression artérielle et du débit cardiaque (Blackstone *et al.* 2005). Ces effets de H_2S inhalé ont été observés à des faibles doses ce qui montre un effet concentration-dépendante. L'effet est parfaitement réversible en quelques minutes à l'arrêt de l'administration du gaz et les souris ne présentent pas de troubles fonctionnels ou comportementaux à court et moyen termes.

Une étude complémentaire de l'équipe de Volpato du Massachusetts General Hospital, à Boston, a été présentée au Congrès de la Société Américaine de Physiologie en octobre 2006 : ils ont étudié dans des conditions similaires à celles de l'équipe de Blackstone, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la température centrale du rat, et son niveau d'activité. Tous les paramètres étudiés chutent de façon certaine et spectaculaire. Ils ont toutefois constaté qu'il n'y avait pas de chute de la pression artérielle associée, comme on aurait pu l'attendre. Cet état est réversible rapidement après l'arrêt de l'administration d'H_2S. L'expérience a été répétée avec une température ambiante plus élevée (35°C vs 27°C), permettant d'objectiver une augmentation de la pression artérielle moyenne (PAM), en rapport avec une diminution du débit cardiaque mais avec un maintien du volume d'éjection systolique (VES), ceci grâce à des mesures échocardiographiques.

Récemment, une nouvelle étude de l'équipe de Blackstone (Blackstone *et al.*, 2007) suggère, chez la souris, qu'une exposition préalable de 20 minutes à H_2S réduit la demande en

oxygène, permettant de survivre à des FiO_2 extrêmement basses pendant quelques heures. H_2S pourrait alors être utile pour prévenir les dégâts causés par l'hypoxémie (Blackstone *et al.* 2007). Une partie des effets protecteurs d'H_2S pourrait être liée à l'hypothermie induite, celle-ci conférant en effet une résistance à l'hypoxie chez les souris (Minard *et al.* 1982). Cependant, cet effet métabolique n'est pas retrouvé chez les mammifères de taille supérieure. L'effet bénéfique d'H_2S en tant qu'inducteur d'hypothermie et d'hypométabolisme est actuellement remis en question. Haouzi *et al.* (Haouzi *et al.* 2011) critiquent le modèle murin d'hypothermie/hypométabolisme de Blackstone *et al.* (Blackstone *et al.* 2007, 2005) qui est comparé au plus gros mammifère, l'homme. En réponse à l'hypoxie, les petits mammifères sont capables d'abaisser leur métabolisme basal, sans aucune intervention pharmacologique. Les souris ont un métabolisme 15 à 20 fois supérieur au métabolisme basal de l'homme, en raison d'une importante production d'énergie par la thermogénèse non-induite par les frissons (*nonshivering thermogenesis*) liée à l'activité des protéines découplantes. Ce mécanisme est nécessaire au maintien de l'homéothermie chez le petit mammifère, mais est absent chez les plus gros animaux ou chez l'homme adulte. L'H_2S pourrait avoir un effet métabolique direct chez le gros mammifère (Dewall *et al.* 2011, Wagner *et al.* 2011).

1.3.2. Rôle de H_2S dans l'inflammation

H_2S exercerait à la fois des effets pro-inflammatoires (Collin *et al.* 2005 ; Zhang *et al.* 2007 ; Zhang *et al.* 2008) et anti-inflammatoires (Ganster *et al.* 2010, Sivarajah *et al.* 2009, Elrod *et al.* 2007).

Parmi les études qui se sont intéressées aux effets pro-inflammatoires de H_2S, citons celles qui ont utilisé le PAG comme inhibiteur endogène de l'H_2S, mettent en évidence : une atténuation des lésions d'organes, une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, une diminution de l'activité des myélopéroxydases dans le poumon et le foie et l'inhibition de l'activation des leucocytes dans les modèles d'endotoxinémie induite par le LPS (Li *et al.* 2008, Collin *et al.* 2005) ou de choc septique par péritonite bactérienne (Zhang *et al.* 2008 [01] et [02], 2007, 2006). En accord avec ces résultats, dans des modèles de sepsis similaires chez la souris, l'administration de donneurs d'H_2S, le NaHS, semble aggraver les lésions tissulaires d'origine inflammatoire (Zhang *et al.* 2006, Li *et al.* 2005). Cet effet pro-inflammatoire est lié principalement à l'augmentation de la dégradation du facteur IκB-α et à l'activation de NF-κB (Zhang *et al.* 2006 ; Zhi *et al.* 2007). Zhi et al ont rapporté une

activation de la voie NF-κB dans les cellules monocytaires humaines U937 suite à un traitement par NaHS aux concentrations de 0,01 ; 0,1 et 1 mM pendant 10 à 120 min (Zhi *et al.* 2007). Ces résultats sont contradictoires avec les résultats observés dans les modèles d'ischémie/reperfusion et dans d'autres modèles d'inflammation. En effet, NaHS inhibe la dégradation du facteur IκB-α et la translocation nucléaire du NF-κB dans des cellules endothéliales humaines en présence de TNFα (*tumor necrosis factor α*) et au niveau rénal dans des situations d'I/R chez le rat (Li *et al.* 2011). La conséquence fonctionnelle de la réduction de l'activation de NF-κB dans les cellules inflammatoires est la diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires impliquant principalement les gènes codant pour la iNOS (*inductible nitric oxidase synthase*) et la COX-2 (cyclooxygenase-2) mais également les gènes de l'expression des cytokines/chimiokines de l'inflammation et les gènes d'expression des molécules d'adhésion (Li *et al.* 2011). Pour confirmer les effets protecteurs anti-inflammatoires de H_2S, l'étude de Zanardo et de ses collaborateurs a rapporté une réduction de l'infiltration leucocytaire et la formation d'œdème chez des rats injectés par des donneurs de H_2S, NaHS et Na_2S (Zanardo *et al.* 2006). Dans un modèle de lésions pulmonaires chez des rongeurs, le NaHS diminue l'influx des neutrophiles au niveau pulmonaire et la production de cytokines pro-inflammatoires (Faller *et al.* 2010). En outre, chez la souris ayant une lésion pulmonaire aiguë par inhalation de fumée, le traitement par H_2S diminue la concentration tissulaire d'IL-1β et augmente celle d'IL-10, diminue l'oxydation des protéines dans le poumon et augmente la survie des souris (Li *et al.* 2008).

Dans un modèle de choc septique par péritonite bactérienne chez la souris, Spiller *et al.* ont montré que H_2S restaure la capacité de migration des neutrophiles vers le site infectieux et augmente la survie dans le sepsis sévère par un mécanisme dépendant des canaux potassiques ATP-dépendants (Spiller *et al.* 2010).

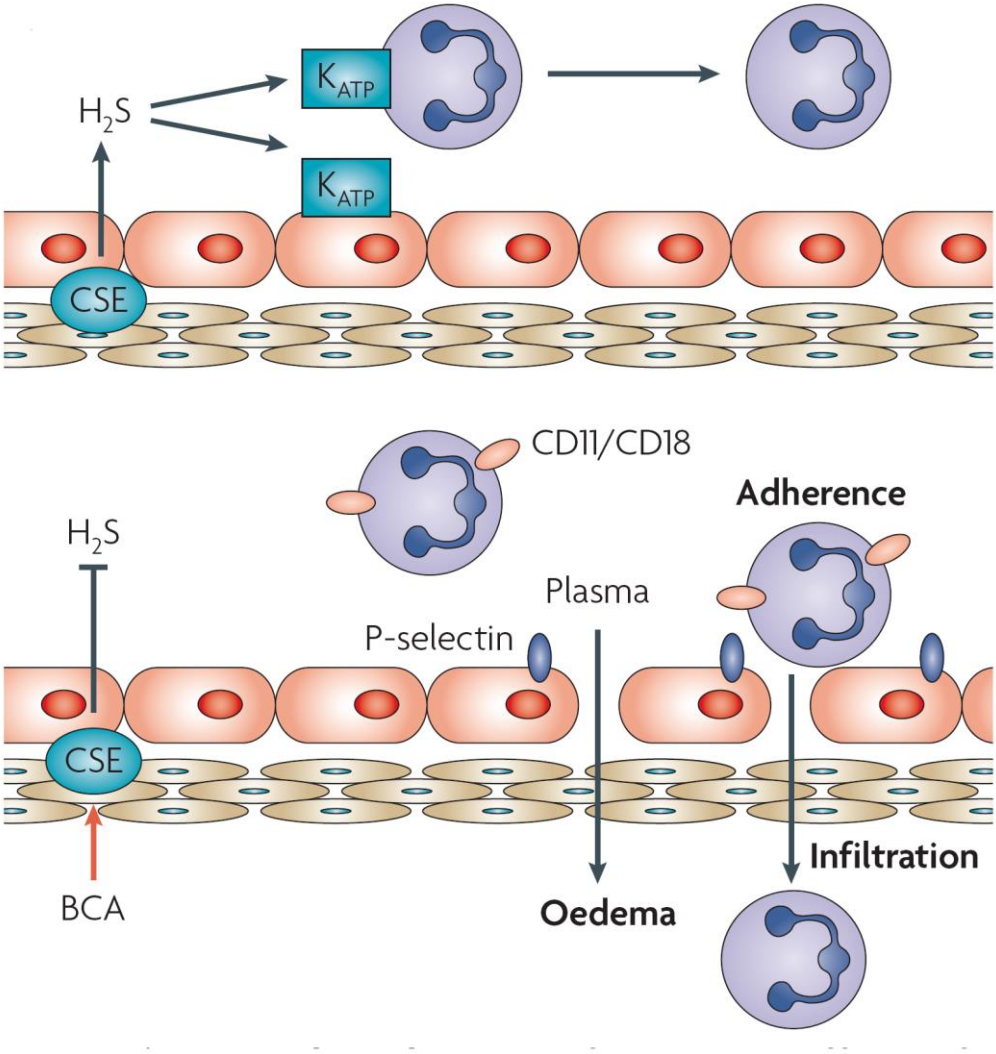


Figure 29: Représentation schématique des mécanismes potentiels des effets protecteurs de H_2S
(Szabo *et al.* 2007)

H_2S module le processus inflammatoire à l'interface leucocytes-endothélium. Sous conditions normales, H_2S est synthétisé dans les vaisseaux sanguins par la CSE qui est exprimée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. H_2S inhibe l'adhérence des leucocytes via l'activation des canaux K_{ATP} sur les leucocytes et l'endothélium. Lorsque la synthèse endogène d'H_2S est inhibée (par exemple avec la β-cyanoalanine, BCA), le roulement des leucocytes (« *leukocytes rolling* ») et l'adhésion à l'endothélium vasculaire sont augmentés, probablement du en partie à une expression élevée des molécules d'adhésion sur les leucocytes (CD11/CD18) et les cellules endothéliales (P-sélectine). L'augmentation marquée de la perméabilité endothéliale résultant de la formation d'œdème se produit également lorsque la synthèse d'H_2S est supprimée.

Cependant, la diversité des modèles et la grande variation des concentrations d'H_2S utilisées rendent ces résultats difficilement comparables. Ces disparités entre les résultats observés sont probablement dues à des différences méthodologiques selon les modèles animaux utilisés mais aussi selon les modes, les doses et la période d'administration d'H_2S

(Wagner *et al.* 2009). Par conséquent, l'H_2S peut soit inhiber soit activer le système inflammatoire de façon très dépendante dans chaque protocole (cf. Figure 29).

1.3.3. Rôle de H_2S dans l'apoptose

Plusieurs études rapportent un effet de H_2S en tant que perturbation d'équilibre entre prolifération et apoptose cellulaire. Ces études montrent que les effets hétérogènes de l'H_2S, entre l'induction de l'apoptose et la protection cellulaire, pourrait dépendre en grande partie de la dose, de la durée d'exposition et du modèle cellulaire étudié (Christl *et al.* 1996 ; Deplancke *et al.* 2003 ; Ramasamy *et al.* 2006 ; Reiffenstein *et al.* 1992).

Ainsi, l'H_2S exogène de façon dose-dépendante induit l'apoptose via l'activation de la voie des MAPK-ERK (*mitogen activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinases*) (cf. Figure 30) (Yang *et al.* 2004) alors que l'activation d'ERK est généralement associée à un signal prolifératif et anti-apoptotique. L'utilisation d'un donneur d'H_2S, le NaHS dans le traitement de fibroblastes pulmonaires humains provoque des lésions de l'ADN dose-dépendantes et un arrêt du cycle cellulaire (phase G1) initié par la stabilisation de la protéine p53, facteur de transcription impliqué notamment dans les processus d'apoptose (Baskar *et al.* 2007). L'H_2S endogène a également des effets pro-apoptotiques au niveau des cellules musculaires lisses surexprimant la CSE (Yang *et al.* 2006).

Certaines études sont en désaccord avec ces résultats : l'H_2S pourrait être neuroprotecteur en limitant les processus d'apoptose impliquant le stress oxydant (Kimura *et al.* 2006). En effet, grâce à son groupement -SH permettant la réduction des ponts disulfures et l'épuration des radicaux libres, à des concentrations micromolaires, H_2S a également des propriétés anti-oxydantes (Ganster *et al*. 2010).

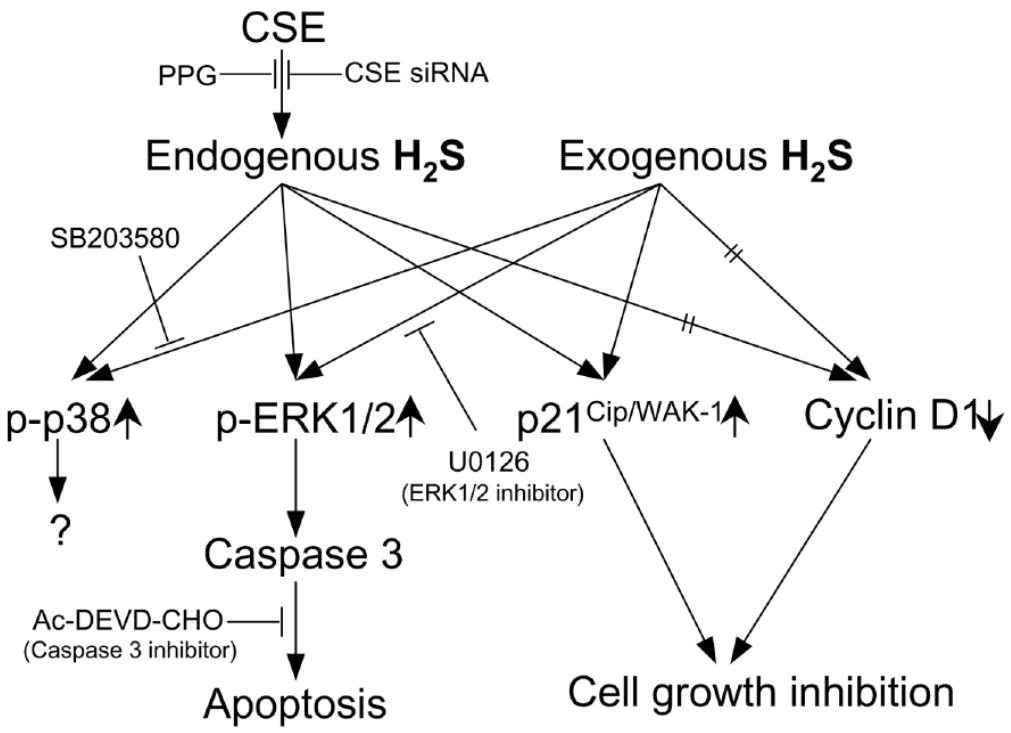


Figure 30: Schéma des voies de transduction des signaux qui sous-entend les changements induits par H_2S sur la croissance cellulaire
(Yang *et al.* 2006)
Le préfixe « p » indique une forme phosphorylée.

1.3.4. Rôle de H_2S dans l'endothélium (la motricité)

La plupart des effets biologiques de l'H_2S rapportés dans la littérature semblent être médiés totalement ou en partie par l'activation des canaux ioniques K_{ATP} dépendants et l'hyperpolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses. Ainsi, chez des animaux qui reçoivent un bloqueur des canaux K^+ ATP-dépendants, l'effet cardioprotecteur d'H_2S est atténué (Sivarajah *et al.* 2009). L'ouverture de ces canaux intervient dans les effets bénéfiques observés lors du préconditionnement à l'I/R (Fiorucci *et al.* 2005 ; Zhang *et al.* 2007) et de la cardiomyoprotection (Zhong *et al.* 2010). Cette voie est impliquée aussi dans la vasodilatation en réponse à une stimulation par le H_2S au niveau des muscles vasculaires lisses (Cheng *et al.* 2004 ; Hosoki *et al.* 1997 ; Zhao *et al.* 2001).

H_2S est également un facteur vasorelaxant endogène observé par l'effet stimulation du NO et l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Toutefois, l'interaction avec le NO reste mal comprise. D'un côté, il semblerait qu'à faible concentration, H_2S favorise l'inactivation du NO par captation (Ali *et al.* 2006). De l'autre côté, H_2S serait un inducteur enzymatique de la NO synthase (iNOS) (Laggner *et al.* 2007).

L'injection intraveineuse d'H_2S provoque une diminution de la pression artérielle chez le rat sans modification de la fréquence cardiaque et agirait spécifiquement au niveau du muscle lisse vasculaire (Zhao *et al.* 2001). Cependant, certaines études attribuent à H_2S un rôle vasoconstricteur. Ali *et al.* ont montré qu'à faible concentration (10 à 100 µM) H_2S exerce un effet vasoconstricteur (Ali *et al.* 2006). H_2S peut être responsable d'une vasodilatation ou d'une vasoconstriction, selon les espèces et les organes considérés (Dombkowski *et al.* 2005). De plus, l'effet dépend de la concentration en oxygène : Koenitzer *et al.* montrent qu'H_2S entraîne une contraction artérielle en présence d'une concentration en oxygène élevée et une relaxation à des concentrations en oxygène plus faibles. A des concentrations d'H_2S et d'oxygène physiologiques, H_2S aurait un effet vasorelaxant (Koenitzer *et al.* 2007).
Avec ses effets sur la contractilité endothéliale, l'H_2S pourrait donc jouer un rôle dans la physiopathologie du choc. Des données contradictoires sont retrouvées dans la littérature en ce qui concerne la nature du rôle joué par H_2S dans les états de choc. Mok *et al.* rapportent que les rats traités par des bloqueurs de la synthèse d'H_2S augmentent la pression artérielle moyenne, de manière temps-dépendant, dans un modèle de choc hémorragique non retranfusé chez le rat (Mok *et al.* 2004) suggérant que H_2S a un rôle dans le choc hémorragique. Alors que dans l'étude de Ganster, sur un modèle de choc hémorragique avec reperfusion, il est montré que l'ajout de H_2S exogène améliore la PAM et a des effets bénéfiques sur l'ischémie (Ganster *et al.* 2010).

1.3.5. Rôle de H_2S dans l'ischémie rénale

Les effets protecteurs d'H_2S exogène et endogène ont été mis en évidence dans plusieurs modèles d'I/R rénales (Tripatara *et al.* 2008, Lobb *et al.* 2014, Simon *et al.* 2010, Xia *et al.* 2009, Xu *et al.* 2009, Hunter *et al.* 2012, Bos *et al.* 2009, Bos *et al.* 2013). L'inhibition ou la stimulation de la production enzymatique de H_2S étaient la principale voie pour les études des effets biologiques de cette molécule sur le rein. Ces études ont montré que non seulement H_2S

aurait des effets bénéfiques au cours de l'ischémie rénale mais aussi ses enzymes de productions pourraient être impliquées dans ce phénomène. Xia et al montrent que la production de H_2S dans le rein est effectuée par CBS et CSE ensemble et que l'inhibition seule de CBS ou de CSE pourrait être compensée par l'activité de l'autre enzyme dans la production de H_2S (Xia *et al.* 2009). Par contre l'équipe de Bos montre que le CSE est l'enzyme essentielle pour la production de H_2S dans le rein et que chez la souris présentant une déficience de CSE ($CSE^{-/-}$), la production de H_2S est diminuée à plus de 90% (Bos *et al.* 2013). Dans le même modèle, Bos et al montrent que CSE protège contre les lésions de l'I/R rénale par la production de H_2S et ses propriétés anti-oxydantes. Le rôle de CBS dans l'ischémie rénale a été étudié par l'équipe de Xu indiquant une diminution de la production de H_2S au cours de l'ischémie suite à la perturbation de l'activité de CBS et résultant en une dysfonction rénale (Xu *et al.* 2009). En outre, l'inhibition de CBS induit une accumulation de Hcy provoquant une aggravation des conséquences de l'I/R rénale (Prathapasinghe *et al.* 2007).

Au cours d'épreuves de clampage de l'artère rénale chez le rat, Tripatara *et al.* ont étudié les effets de H_2S endogène et exogène dans I/R rénale. Ils ont traité les rats avec du PAG (1 ml/kg, ip) 1h avant l'ischémie pour inhiber CSE, et ils ont constaté que les animaux présentaient des niveaux de créatine sérique élevés signifiant une diminution de la fonction rénale. Dans la même expérience, l'effet néphroprotecteur d'un donneur d'H_2S, le NaHS, administré 15 minutes avant le clampage bilatéral des artères rénales a été mis évidence 6 heures après la reperfusion. L'effet bénéfique est observé aussi bien au niveau de la fonction rénale qu'au niveau histologique où les lésions de nécrose tubulaire aiguë sont moins importantes (Tripatara *et al.* 2008). Les effets protecteurs de l'H_2S sur le rein ont été expliqués selon Bos et al principalement par son effet hypométabolique dans un modèle d'I/R bilatérale rénale par clampage des artères rénales pendant 30 minutes chez la souris. L'effet néphroprotecteur d'H_2S a également été mis en évidence dans un modèle d'I/R rénale par clampage chez le porc (Simon *et al.* 2010). Cette étude montre que H_2S diminue la dysfonction d'organe et l'histologie glomérulaire par réduction de l'inflammation, diminution de la formation de NO et réduction du stress oxydatif. Dans une étude récente d'I/R rénale chez le rat, il a été montré que l'amélioration de la fonction rénale par H_2S est associé à une augmentation de l'expression des molécules de pro-survie, une diminution de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques et diminution de l'infiltration des macrophages (Lobb *et al.* 2014).

Ces modèles sont principalement fondés sur des épreuves de clampage de l'artère rénale et ne reflètent que partiellement la complexité de la réponse inflammatoire systémiques et la réalité du choc hémorragique. L'effet d'H_2S et ses mécanismes d'action sur le rein dans le choc hémorragique ont très peu été étudiés. En 2011, Chai *et al.* ont étudié l'effet de H_2S administré juste avant la reperfusion sur un modèle murin de choc hémorragique contrôlé (Chai *et al.*, 2011). Les auteurs ont rapporté un effet bénéfique d'H_2S aussi bien sur l'hémodynamique globale que sur la fonction rénale. Cependant, le niveau de PAM après la reperfusion n'étant pas équivalent dans les deux groupes, il est difficile d'établir si l'effet sur la fonction rénale est attribué aux propriétés propres d'H_2S, ou à l'amélioration de la perfusion rénale.

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Différents travaux mettent en évidence un effet hémodynamique positif et anti-inflammatoire de H_2S dans un modèle d'I/R (Zhao *et al*. 2001, Lowicka *et al.* 2007). Nous avons confirmé ces observations dans un modèle d'I/R par choc hémorragique contrôlé-reperfusé et retransfusé sans remplissage complémentaire chez le rat. La pression artérielle moyenne, la fréquence et le débit carotidien sont améliorés dans le choc hémorragique après l'adjonction d'un donneur d'H_2S, le NaHS. Ce dernier se comporte comme un modulateur de l'inflammation et du stress oxydant dans les lésions d'I/R (Ganster *et al.* 2010). Dans la continuité de ces travaux dans notre laboratoire et pour s'approcher des recommandations européennes de prise en charge des états de choc hémorragique (contrôler le saignement, le remplissage vasculaire et / ou une transfusion sanguine) (Rossaint R, 2010), nous avons testé les effets hémodynamiques de H_2S dans un modèle de choc hémorragique (CH) réanimé et contrôlé par un remplissage vasculaire.

Après la synthèse des différents travaux qui se sont intéressés aux effets de H_2S dans un modèle réanimé (Bracht *et al.*, 2012, Chai *et al.*, 2012, Drabek *et al.*, 2011), nous avons observé que les donneurs de H_2S pourraient avoir des effets protecteurs (Bracht *et al.*, 2012, Chai *et al.*, 2012) ou neutres (Drabek *et al.*, 2011) sur l'hémodynamique et la fonction rénale chez le proc ou le rat. Ainsi, la discordance dans la littérature entre les effets bénéfiques potentiels d'H_2S (Ganster *et al*. 2010) et les effets bénéfiques de son inhibition (Mok *et al*. 2004), dans différents modèles de CH retransfusé ou non retransfusé ont conduit à notre hypothèse qui est basée sur ces mécanismes d'action. H_2S administré au moment de la

reperfusion aurait un effet bénéfique sur l'hémodynamique et la fonction rénale et ces effets bénéfiques sont médiés par les changements microcirculatoires. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de choc hémorragique chez le rat. Il s'agit d'un choc hémorragique contrôlé, selon le modèle classique de Wiggers (Wiggers 1942) et réanimé par des remplissages vasculaires. Puis nous avons étudié les effets d'un donneur exogène d'H_2S (NaHS) et d'un inhibiteur de sa synthèse (PAG) administrés en bolus par voie intraveineuse, sur l'hémodynamique (macro- et microcirculatoire), la fonction et l'histologie rénale.

Après réalisation d'une série préliminaire pour mettre au point le modèle de choc hémorragique avec des remplissages vasculaires, quatre groupes de rats sont anesthésiés, ventilés et différents paramètres hémodynamiques macro- et microcirculatoires en normothermie sont analysés à l'aide d'un monitorage. Nous avons décidé, afin de nous inscrire dans les études expérimentales récentes en matière de choc hémorragique, d'abaisser la PAM à 40 mmHg en 10 minutes puis de la maintenir ainsi pendant une durée de 50 minutes. Dans les groupes choc hémorragique (CH), après 50 minutes de choc, l'administration du produit (NaCl, NaHS ou PAG) en bolus intraveineux est réalisée. La reperfusion est ensuite effectuée dans les trois groupes et les rats sont surveillés jusqu'à 170 minutes après la reperfusion. Divers paramètres hémodynamiques sont enregistrés toutes les 10 minutes (pression artérielle moyenne, fréquence cardiaque, débit carotidien, débit artériel rénal et vitesses de microcirculation rénale) afin d'étayer nos hypothèses et de mettre en évidence :

- Les effets de l'inhibition de H_2S endogène ou l'administration du H_2S exogène sur les vitesses microcirculatoires péritubulaires rénales et sur la fonction rénale.
- Etude de la relation entre les variations hémodynamiques macro et microcirculatoires induites par H_2S.

Comprendre le rôle de la principale enzyme de production de H_2S, la CSE, dans le rein.

3. ARTICLE : *"Effects of hydrogen sulfide on hemodynamic and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats"*

Effects of hydrogen sulfide on hemodynamic and renal function during resuscitated hemorrhagic shock in rats

Abstract:

Introduction: Ischemia reperfusion injuries consecutive to haemorrhagic shock (HS) leads to cardiovascular failure and organ injury. Hydrogen sulphide (H_2S) is among the molecules that were proposed for the treatment of HS. Herein, we compared the effects of D,L propargylglycine (PAG), an inhibitor of H_2S production, as well as sodium hydrosulphide (NaHS), an H_2S donor, on haemodynamics, renal macro and microcirculation and renal function in a rat model of I/R established with reanimated and controlled HS.

Methods: Forty-five rats were mechanically ventilated and instrumented to measure mean arterial pressure (MAP), carotid blood flow (CBF), heart rate (HR), renal blood flow (RBF) and cortical microcirculatory velocities (Vm). Animals were bled during 60 minutes in order to maintain MAP at 40 ± 2 mmHg. Ten minutes prior to retransfusion, rats randomly received either an intravenous bolus of NaHS (0.2 mg/kg) or vehicle (0.9% NaCl) or PAG (50 mg/kg). At the end of experiment (T = 240 minutes) blood were harvested for creatinine and urea analysis and kidneys are taken to assess the markers of vascularity in glomerular lesions by Immunohistochemistry.

Results: PAG-pretreatment animals showed a real renal dysfunction demonstrated by a significant decrease in creatinine clearance and associated with a decrease in cortical

microcirculatory velocities. Hemodynamically, PAG administrated 10 min prior to retransfusion caused a capillary leak syndrome characterized by a large amount of gelatine perfused and confirmed by decreased VEGF and angiopoietin-1 (Ang-1) expression in kidney. Exogenous H_2S administration neither ameliorate renal function nor renal hemodynamic in our reanimated and controlled I/R model. Expression of H_2S-producing enzymes was measured in kidney; this was associated with marked downregulation of CBS and CSE by NaHS treatment.

Conclusion: The inhibition of endogenous H_2S by PAG degrades renal function, alters its microcirculatory velocities and contribute to loss of glomerular capillaries, however, the addition of H_2S via NaHS does not improve renal hemodynamic and function.

Keywords: hydrogen sulphide, hemorrhagic shock, renal microcirculatory, capillary loss, VEGF, Ang-1, cystathionine-β-synthase, cystathionine-γ-lyase.

Introduction:

According to the pathophysiology of hemorrhagic shock (HS), vasoconstriction state turns into vasodilatory shock. This phenomenon is related to tissue hypoxia as well as to a proinflammatory immune response (Landry DW *et al* 2001). In addition, during the reperfusion phase, cellular injuries induced by ischemia are enhanced, and are associated with excessive production of radical oxygen species (ROS), leading to a further systemic inflammatory response (Collard CD *et al*. 2001).

These systemics disturbances resulting from resuscitated HS may occur inducing further damages to organs and may lead ultimately to death (Gutierrez *et al.* 2004). In fact, endothelial dysfunction generated by HS leads to capillary leakage by increasing endothelial permeability. This leakage causes the formation of capillaries oedema causing an oxygen diffusion disorders and leads to tissue hypoxia. Kidney appears among victims. Therefore, developments of protective treatments against multiple organ failure are mandatory in order to expect improvement of HS outcome.

Endogenous hydrogen sulfide (H_2S) has been recently identified as a player in HS. In mammals, H_2S is synthesized through desulphhydration of cysteine by either cystathionine-β-synthase (CBS) or cystathionine-γ-lyase (CSE), both are pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes (Wagner F *et al.* 2009, Tripatara P *et al.* 2008). The production of H_2S is tissue-specific; CBS is the predominant enzyme in the nervous system and CSE in the cardiovascular system (Wang R 2002, Zhao W *et al.* 2003). Both CBS and CSE have been reported to be present in the kidney (Stipanuk M.H *et al.* 2003, House J.D *et al.* 1997), mainly in renal proximal tubules (House J.D et al 1997, Ishii I *et al.* 2004, Li N *et al.* 2006). H_2S was shown to be associated with anti-inflammatory (Simon F et al 2010, Lowicka *et al*. 2007), anti apoptotic (Minamishima S et al 2009, Elrod JW et al 2007) anti oxidative (Sivarajah A et al 2009, Ganster F et al 2010) properties.

For instance, many experimental studies have demonstrated the beneficial effects of H_2S modulation in hemorrhagic shock (Issa K et al 2013, Van de Louw A et al 2012, Ganster F et al 2010, Mok YY et al 2008, Morrison ML et al 2008, Mok YY et al 2004). However, these models are based on non fluid as well as non transfused hemorrhagic shock and are far from the European guidelines (i.e. bleeding control, fluid replacement and/or blood transfusion) (Rossaint R Crit Care 2010) except for three experimental studies who reported both protective (Bracht CCM 2012, Chai Surg research 2012) or neutral (Drabek Shock 2011) effects of H_2S donors, on kidney function in a retransfused models of hemorrhagic shock in pigs or rats. However in these studies the authors did not assess the effects of H_2S on microcirculation as well as the effects of endogenous H_2S. Therefore, in order to assess the renal hemodynamics (macro and micro-circulations) and function of H_2S modulation either with a H_2S donor (sodium hydrosulfide: NaHS) or inhibitor (dl-propargylglycine: PAG) in a clinical relevant model of HS, we designed an experimental study, in blood and fluid resuscitated rat model of HS.

Materials and methods:

The animal protocol was approved by the regional animal ethics committee (CREEA-Nantes, France). The experiments were performed in compliance with the European legislation on the use of laboratory animals.

Animals:

Adult female Wistar rats, weighing 260 ± 20 g, were housed with 12-hours light/dark cycles in the animal facility of the University of Angers (France).

Surgical procedure:

Animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (50 mg/kg of body weight) and placed on a homeothermic blanket system to maintain rectal temperature between 36.8°C and 37.8°C throughout the experiment. After a local anesthesia with lidocaïne 1% (Lidocaïne® 1 % Astra Zenecca), a tracheotomy was performed. Animals were mechanically ventilated (Harvard Rodent 683 ventilator, Harvard Instruments, South Natick, MA) and oxygen was added in order to maintain a PaO_2 above 100 mmHg. The left carotid artery was exposed, and a transit-time ultrasound flow probe of 2.0 mm (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) was attached to continuously measure carotid blood flow (CBF). A second transit-time ultrasound flow probe was attached to renal artery to measure the renal blood flow (RBF).

After a local anesthesia, the femoral artery was canulated both to measure mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) and for the induction of HS. The homolateral femoral vein was canulated for retransfusion of shed blood, for fluid maintenance and for bolus infusion (vehicle, NaHS or PAG).

Group randomization:

This prospective experimental study randomly allocated rats in 4 groups: Control (No Shock, n=5) and three HS groups: Sham (HS-NaCl, n=15), H_2S donor (HS-NaHS n=15) or with H_2S inhibitor (HS-PAG, n=10).

Induction of hemorrhagic shock and experimental model (Figure 1):

After an initial 20 minutes stabilization, controlled haemorrhage (Wiggers C 1942) was induced by withdrawing blood in 10 minutes until mean arterial pressure (MAP) decreased to 40 ± 2 mmHg. Blood was stored in heparinized syringe (200 UI). MAP was maintained at 40 ± 2 mmHg for 60 minutes. A MAP drop below 38 mmHg led to blood reinjection; conversely, an additional exsanguination was achieved when MAP overcome 42 mmHg. NaHS (single intravenous bolus 0.2 mg/kg body weight), vehicle (saline NaCl 0.9%) or PAG (50mg/kg) were administrated 10 minutes before retransfusion time.

After 60 minutes of hypotension, shed blood was retranfused within 10 minutes. Rats were continuously monitored for heart rate (HR), MAP, carotid blood flow (CBF), renal blood flow (RBF) and cortical microcirculatory velocities (Vm, see below) during 180 minutes. Maintenance of fluid was performed with a perfusion of 1.2mL of 0.9% NaCl per hour in all groups. In HS groups, after the retransfusion MAP was maintained higher than 90 mmHg with gelatine infusion (Gelofusine® 4%, B. Braun Medical, Boulogne, France) with a rate of 0.2 mL every 10 minutes. Rats were considered refractory to fluid infusion when MAP did not increase above 90 mm Hg with 0.2 mL of gelatin and they where sacrificed immediately in order to avoid the influence of hypotension on kidney function. The amount of gelatin was recorded.

At the end of the experiments, animals were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital and blood was drawn for creatinine measurements (CreatininasePeroxydase, C16000 Abbott, Illinois, USA).

Microcirculation imaging and peritubular blood velocity measurements

Video sequences of 10-sec duration were obtained with a SDF camera for every set of measurements. The camera was slightly displaced between each sequence to allow observation of different cortical regions. Digital sequences were stored and analyzed off-line with specifically designed software (AVA 3.0, MicroVisionMedical, Amsterdam, The Netherlands). Video analyses were performed blinded to both group and steps. After image stabilization and averaging, displacements of blood cells in cortical peritubular capillaries were observed. White blood cell displacement through the capillaries creates an observable artifact among red blood cells; the velocity of this artifact can be measured using timeframe analysis, as previously reported. In capillaries (blood vessel diameter < 10 µm), blood cell velocity can be considered as blood velocity (Goedhart P *et al.* 2007). For each video sequence, blood velocities were measured in 5 different blood vessels and averaged. In a pre-study, intra-observer reproducibility testing for blood velocity measurements over a video sequence displayed good reliability of measurements (inter-class correlation 94%; 95% CI 92–99%). Inter-observer reproducibility testing also displayed good agreement between operators (inter-class correlation 90%; 95% CI 88–97%).

Monitoring and measurements:

Arterial blood gases were controlled after the stabilization period in order to set mechanical ventilation. Blood gases, acid-base status and blood glucose were recorded at baseline (t=0 min), the end of retransfusion (t=70 min) and at the end of the experiment

(t=240 min). MAP, HR, CBF, RBF SDF-videos and temperature were recorded at stabilization (baseline) period and every 10 minutes during the observation period.

Hydrogen sulfide donor preparation:

The deshydrated donor of H_2S, NaHS (sodium hydrogen sulfide, Alpha Aesar GmbH & Co, UK), was dissolved in isotonic saline (40 mM) divided into aliquots single 2 mL, and packed under argon gas bubbling. To avoid side effect such as airway irritation, intravenous bolus of NaHS (0.2 mg/kg) was preferred to inhalation.

In vitro study: Immunohistochemistry

5µg frozen renal sections were rehydrated in Tris-buffered saline (TBS), pH 8.0 for 20min. Then blocked for 30 min at room temperature (RT) with 10% (see below): normal donkey serum, for albumin and angiopoietin-1 antibodies, or normal goat serum for CSE, CBS and VEGF antibodies. Sections were washed 1 time in TBS before being incubated with primary antibody (see below) for 1 hour at RT. After rinsing 3 times in TBS, sections were incubated with secondary antibody (see below) for 30 minutes at RT, washed 3 times in TBS and exposed to substrate colometric reaction: Dako REAL AP Substrate kit (Dako) for 15min at RT. Then slides were immersed in a bath of Mayer's hematoxylin for 1 min after rinsing 3 times. Finally coverslip was washed and slides were evaluated using Zeiss Axio Imager A1 and Axio Vision Software at a magnification of 10X, multiple fields of 800.000 μm^2 area were measured.

The following antibodies were used:

Primary antibodies and their correspondent serum:

Blocking for goat IgG was 10% normal donkey serum:

Albumin ALB (Santa Cruz) polyclonal goat IgG 1:60 dilution

Angiopoietin-1 (R&D) polyclonal goat IgG 1:50 dilution

Blocking for rabbit IgG was 10% normal goat serum:

CSE (proteintech) polyclonal rabbit IgG 1:100 dilution

CBS (Santa Cruz) polyclonal rabbit IgG 1:100 dilution

VEGF (abcam) polyclonal rabbit IgG 1:300 dilution

Secondary antibodies:

Anti Rabbit IgG Alkaline Phosphatase (Jackson ImmunoResearch) 1:25

Anti Goat IgG Alkaline Phosphatase (Jackson ImmunoResearch) 1:25

Statistical Analysis:

Data were analysed in GraphPad Prism 4.0 Software. For repeated measurements, one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. Difference between groups was tested using a two-way analysis of variance (repeated time measurements and treatments as independent variables). When the relevant F values were significant at the 5% level, further pairwise comparisons were performed using the Dunnett's test for the effect of time and with Bonferroni's correction for the effects of treatment at specific times. The Quantitative data were compared with the Kruskall-Wallis test or Wilcoxon test as appropriate for inter-group comparisons. All values are presented as mean ± SD for n experiments (n representing the number of animals). An associated probability (p value) of less than 5% was considered significant.

Results

All hemorrhagic groups were similarly bled (4.4 ± 1.2 mL, 4.5 ± 1.1 mL and 4.4 ± 1 mL for HS-NaHS, HS-NaCl and HS-PAG groups, respectively).

HR, MAP and CBF remained stable throughout the experiment in the control group (Table 1). Compared to baseline, blood withdrawal from rats subjected to haemorrhagic shock and retransfusion, significantly decreased MAP, HR, CBF, RBF (Fig.1) as well as renal cortical microcirculation without intergroup differences.

During the post transfusion period, MAP was maintained above 90 mm Hg by design with gelatine fluid resuscitation without any significant difference between the three hemorrhagic groups. HR, CBF, and RBF were similar in these three groups. As we can see from Fig.2, gelofusin® reperfusion data demonstrate that the HS-PAG group required significantly more fluid resuscitation with gelatine in comparison to HS-NaCl and HS-NaHS groups in order to obtain the same systemic hemodynamics.

By Immunohistochemistry (IHC) we evaluated the markers for vascular permeability in kidney samples, results are given in Fig.3. HS-PAG group decrease significantly the expression of VEGF and Ang-1 proteins in comparison to HS-NaCl group. Renal albumin expression is also decreased with PAG treatment in comparison with CT group. H_2S enzymatic production in kidney was evaluated by IHC. HS-PAG group as well as HS-NaHS group decrease significantly the kidney expression of CSE compared to CT and HS-NaCl groups as illustrated by Fig.4.

The analysis of the renal cortical microcirculation shows that compared to HS-NaCl and HS-NaHS, hemorrhagic rats treated with PAG (HS-PAG) had significantly lower blood flow during the post hemorrhagic period (Fig.5).

At the end of the experiment, serum creatinine and urea measurements were performed to quantify the renal function loss associated with renal I/R. According to Fig 6, the cumulative

urine output was similar in the three hemorrhagic groups however compared to HS-NaCl and HS-NaHS, creatinine clearance decreased significantly in hemorrhagic rats treated with PAG (HS-PAG).

Throughout the experiment, rat's body temperature was continuously maintained at 37.8 ± 2°C by rectal thermometer similarly in all groups.

All HS-NaCl and HS-NaHS-treated animals were hemodynamically controlled with gelatine infusion of 0.2 mL every 10 minutes whereas, 6 animals out of 10 in the HS-PAG group met the criteria of refractoriness to fluid within four hours of experimentation and considered as refractory hypotension. The mean survival time after retransfusion in the HS-PAG group was 149 ± 33 minutes and 180 minutes for the other groups.

Discussion

Our aim was to describe the respective effects of H_2S on renal cortical microcirculatory blood flow as well as on kidney function. For this purpose we focused both on a strict control of the systemic hemodynamics with fluid resuscitation and we assessed the effects of H_2S modulation by infusing H_2S donors or inhibitors. Our main results are the followings: for the same systemic hemodynamics (i.e. MAP and RBF), addition of exogenous H_2S did alter neither renal cortical microcirculatory blood flow nor kidney function. Conversely inhibition of endogenous H_2S synthesis with PAG induced a decrease in renal cortical microcirculatory blood flow, worsened renal function and increased fluid resuscitation requirements in order to maintain the same systemic hemodynamics.

H_2S is reported to have many effects such as suspended animation (Blackstone E *et al.* 2005), beneficial (Ganster F *et al.* 2010) or detrimental (Mok YY et al 2004) hemodynamic effects, pro- (Collin M et al 2005) or anti-inflammatory (Simon F et al 2010), anti-apoptotic (Minamishima S et al 2009,) or pro-apoptotic (Mariggio MA et al 1998) and/or anti oxidative (Sivarajah A et al 2009, Ganster F et al 2010) as well as stress oxidant features. In our study, we paid attention to maintain constant body temperature in order to rule out the putative effects of down metabolism on the kidneys.

Previous studies that have focused on hemodynamics after HS reported conflicting results. Mok *et al* reported beneficial effect on hemodynamics as well as anti-inflammatory response of endogenous H_2S inhibition with PAG (pre and post treatment) in a non-resuscitated rat model of hemorrhagic shock (Mok YY et al 2004, Mok YY et al 2008). Conversely our group (Ganster F et al 2010) and others (Chai W et al 2012, Bracht H et al 2012, Khodor I et al 2013, MorrissonML 2008, Gao C et al 2012) have reported beneficial hemodynamic effects associated with anti-inflammatory response and increased survival rate in various

experimental models of hemorrhagic shock treated with H_2S donors. Whether retransfusion and or fluid resuscitation after shock period have influenced the results is unknown. Therefore in order to avoid the influence of post resuscitation hypotension induced by the hemorrhagic shock we aimed at comparing H_2S modulation on systemic and renal hemodynamics. For this purpose, we adjusted the fluid resuscitation on MAP in all hemorrhagic groups (sham, H_2S donor and inhibitor) in order to avoid the interference of the systemic hemodynamics on the microcirculatory cortical renal blood flow. One of the main results of our study is that inhibition of endogenous H_2S synthesis induced increased requirements of fluid to reach the same systemic hemodynamic goal, suggesting an increased capillary leak in rats treated by PAG. Our results support those of Issa *et al* who reported in a transfused but not fluid resuscitated model of hemorrhagic shock a detrimental effect on endothelial function and pro-inflammatory as well as pro oxidant stress responses when endogenous H_2S synthesis was inhibited by PAG. The endothelial dysfunction generated by the hemorrhagic shock and aggravated by the endogenous H_2S inhibition, leads to capillary leakage by increasing endothelial permeability. This leakage causes the formation of capillaries oedema causing an oxygen diffusion disorders and leads to tissue hypoxia. VEGF is a hypoxia induced angiogenic factor (Lin et al 2011). VEGF and Ang-1 control the endothelial permeability, but in the opposite way: VEGF (whose first name was vascular permeability factor) increases the plasma leakage, whereas angiopoietin-1 it opposes as shown in Yancopoulos group (Ang-1 completely protects the animal from the VEGF entailed capillary leak.) (Thurston *et al*. 2000). To measure the capillary leakage in kidney we have used the immuno-histochemistry method for Albumin, VEGF (vascular endothelial growth factor) and angiopoietin-1 (Ang-1) dosages. Our results demonstrate that endogenous H_2S inhibition by PAG promotes hypoalbuminemia, which reflect the renal leak state, and increase the capillary leak risks by reduction in Ang-1 protein. Ang-1 reduction by PAG induces loss of glomerular capillaries during HS. The

decrease in renal Ang-1 protein was associated with marked reduction of VEGF protein in kidney. As can be explained by Yuan et al, in a mouse model of anti-glomerular basement membrane, the loss of glomerular capillaries is associated with decrease in endothelial survival molecules VEGF and Ang-1, and up-regulation of Ang-2, an antagonist of Ang-1 (Yuan et al 2002). Therefore, we suppose that endogenous H_2S may be essential to prevent the kidney against loss of glomerular capillaries. However, NaHS treatments showed also a significant reduction in renal VEGF expression after HS. Si et al explained the concomitant reduction of vitreous VEGF content and gene expression following treatment with exogenous H_2S by a reduction in vascular permeability in retinas of STZ-induced diabetic rats (Si et al 2013). The reduction in renal VEGF protein after NaHS treatment in HS rats could be associated with vessel regression and tends to be anti-angiogenic, so it could enhance endothelial apoptosis. In our experimental model, PAG treatment is associated with hypoalbuminemia, increased capillary permeability and especially decreased creatinine clearance reflecting the impairment of renal function. Tripatara et *al.* reported, also, that the irreversible inhibition of H_2S by PAG increased the renal dysfunction caused by an experimental model of IRI induced by bilateral renal occlusion by clamping the renal pedicles in rats.

To the best of our knowledge no study reported the effects of H_2S modulation on the microcirculatory blood flow in HS. In our *in vivo* model, we controlled very strictly systemic hemodynamics to avoid the consequences of systemic hemodynamic changes on renal cortical microcirculatory blood flow. Compared to sham and H_2S donors, inhibition of endogenous H_2S synthesis was associated to a decrease in renal microcirculatory blood flow and worsening of renal function as well. H_2S is an agonist of potassium-dependent ATP channels and induces potassium efflux from the vascular smooth cells and in turn hyper-polarization and vasodilation. One can speculate that inhibition of endogenous H_2S with PAG (Khador I *et*

al 2013, Zhao W *et al* 2001) may have limited the post ischemic vasodilation (by increasing renal vascular resistances). Various findings support this concept (Szabo C *et al* 2007, Lowicka E *et al* 2007, Pryor WA *et al* 2006): potassium-dependent ATP channel blockers (sulfonylurea derivates – for example, glibenclamide) attenuated the H_2S-induced vasodilation both *in vivo* and *in vitro* (Tang G *et al* 2005, Zhao W *et al* 2001).

The microcirculatory effects of H_2S were reported both in liver (lipopolyssachride challenge Norris *et al* 2013) and kidney (Zhu *et al* 2012) in rat with a vasoconstrictive effect on liver sinusoidal microcirculation and vasodilation in peritubular cortical renal capillaries. Whether the organ or the model influenced the results remains speculative.

Expression of H_2S-producing enzymes was measured in kidney; this was associated with marked reduction of CSE but not CBS expression after PAG treatment in HS. These results confirm the normal effect of PAG such as CSE inhibitor and indicate that the deleterious effect shown with PAG treatment on renal function most likely through the inhibition of CSE. According to Bos et al., CSE is the most essential H_2S-producing enzyme in the kidney, and renal H_2S-production was reduced by more than 90% in CSE-deficient mice (Bos *et al.*, 2013). However, Xu et al., reported that administration of PAG markedly reduced CSE activity in the kidney, but did not affect renal H_2S level (Xu et al., 2009). This result is compatible with those shown by Xia et al., who conclude that both CBS and CSE were functioning to produce H_2S in the kidney and that the inhibition of CBS or CSE alone could be compensated by the increase of the activity of the other enzyme in the H_2S production (Xia et al., 2009). In the other hand, treatment with exogenous H_2S reduced CBS and CSE expression in kidney of hemorrhagic shock rats. Our result indicated that H_2S itself could regulate expression of H_2S-producing enzymes and there might be a negative feedback regulation between circulating exogenous H_2S and CSE/CBS genes expression. Ma et al in

atherosclerotic-like lesions study in rabbits suggested that NaHS treatment decreased CSE mRNA expression in femoral arteries by a negative feedback control of CSE activity (Ma *et al.* 2012). Also, a negative feedback regulation in CBS/H_2S pathway of NaHS treatment was reported by Si et al. in both plasma and retinas of STZ-induced diabetic rats (Si et al 2013). This negative control of H_2S production could be the reason for the lack of effect of NaHS shown in our study. Indeed, in our short term study (3 hours), additional infusion of NaHS neither altered systemic hemodynamics and renal microcirculation nor renal function. Exogenous H_2S has no effect, also, on vascular permeability. This lack of effect on hemodyanmics might also be explained in part by our study design (tight control of MAP with fluid resuscitation with subsequent similar arterial renal blood flow). In a controlled HS followed by retransfusion and fluid resuscitation in a long term model in pig Bracht *et al* reported decrease in creatinine in animals treated with H_2S donor (Na_2S) and Drabek *et al* reported an increase in creatinine in pigs treated with NaHS (Bracht *et al* 2012, Drabek *et al* 2011).

Finally, the HS-PAG group also presented with altered survival, this could be explained by the renal microcirculation disturbance and renal dysfunction. In our model, the renal injury resulting from hemorrhagic and reperfusion state, turn to a decompensate phase after endogenous H_2S inhibition and lead to animal hymodynamic death speculated by a spontaneous decrease of MAP under 90 mm Hg despite fluid resuscitation. Issa et al have been demonstrated also that PAG-treated from hemorrhagic shock rats had a MAP < 40 mm Hg at the end of experiment and considered as equivalent to death. However, consequently to our short term study, we are unable to show a survival improvement after exogenous H_2S administration in comparison of sham group.

Study limitations

The present study has several limitations. By design, in order to mimic a realistic emergency clinical situation, we used a single i.v. dose of NaHS. Indeed, given the potential harmful effects of H2S on cytochrome c and the lack of data pertaining to the ideal target dose in the literature, we chose to infuse a single bolus dose of H_2S as we already did in our previous experimental study where we demonstrated beneficial effects of a single dose of 0.2 mg/Kg just before retransfusion. Since a dose-response study was not performed, it is possible that we may have missed toxic or beneficial potential effects of the hydrogen sulfide donor. In addition, our model of HS should be considered as a short model, this may also influence the development of renal failure, which could also be influenced by the fluid resuscitation. Finally, and by design it was not possible to depict whether the microcirculatory changes were related or not to the inflammatory response induced by HS.

Conclusion:

In a rat model of controlled hemorrhagic shock resuscitated with blood transfusion and intravenous fluids to maintain MAP and RBF constant, inhibition of endogenous H_2S by PAG reduces renal cortical peritubular microcirculatory blood flow and is associated with renal dysfunction and increased capillary leak syndrome by Ang-1 inhibition. Administration of exogenous H_2S donor has no influence on the renal cortical microcirculatory blood flow as well as renal function.

References:

1. Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H2S induces a suspended animation-like state in mice. Science 2005;308:518.
2. Bos EM, Wang R, Snijder PM, Boersema M, Damman J, Fu M, Moser J, Hillebrands JL, Ploeg RJ, Yang G, Leuvenink HGD, and van Goor H. Cystathionine g-Lyase Protects against Renal Ischemia/Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. J Am Soc Nephrol 2013; 24: 759–770.
3. Bracht H, Scheuerle A, Groger M, Hauser B, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Wachter U, Vogt JA, Asfar P, Matejovic M, Moller P, Calzia E, Szabo C, Stahl W, Hoppe K, Stahl B, Lampl L, Georgieff M, Wagner F, Radermacher P, Simon F: Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock. Crit Care Med 2012, 40:2157-2167.
4. Chai W, Wang Y, Lin JY, Sun XD, Yao LN, Yang YH, Zhao H, Jiang W, Gao CJ, Ding Q: Exogenous hydrogen sulfide protects against traumatic hemorrhagic shock via attenuation of oxidative stress. J Surg Res 2012, 176:210-219.
5. Collard CD, Gelman S: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology 2001, 94:1133-1138.
6. Collin M, Farhana B.M. Anuar, 1Oliver Murch, Madhav Bhatia, Philip K. Moore, Christoph Thiemermann. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. British Journal of Pharmacology (2005) 146, 498–505.
7. Drabek T, Kochanek PM, Stezoski J, Wu X, Bayir H, Morhard RC, Stezoski SW, Tisherman SA: Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. Shock 2011, 35:67-73.
8. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:15560–15565
9. Eric J. Norris,1 Nicole Feilen,1 Nhat H. Nguyen,2 Cathy R. Culberson,1 Min C. Shin,2 Madeleine Fish,1 and Mark G. Clemens. Hydrogen sulfide modulates sinusoidal constriction and contributes to hepatic micorcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G1070–G1078, 2013.
10. Eric J. Norris, Sebastian Larion, Catherine R. Culberson, and Mark G. Clemens. Hydrogen sulfide differentially affects the hepatic vasculature in response to

phenylephrine and endothelin 1 during endotoxemia. SHOCK, Vol. 39, No. 2, pp. 168Y175, 2013

11. Ganster, F., M. Burban, *et al,*. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Critical Care* 2010;**14**(5): R165.
12. Gao C, Xu DQ, Gao CJ, Ding Q, Yao LN, Li ZC, Chai W: An exogenous hydrogen sulphide donor, NaHS, inhibits the nuclear factor kappaB inhibitor kinase/nuclear factor kappab inhibitor/nuclear factor-kappaB signaling pathway and exerts cardioprotective effects in a rat hemorrhagic shock model. Biol Pharm Bull 2012, 35:1029-1034.
13. Goedhart P, Khaliizada M, et al. Sidertream Dark Field (SDF) imaging : a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. Opt Express 2007;15(23):15101-14.
14. Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME. Clinical review: Hemorrhagic shock. Crit Care 2004;8:373.
15. House, JD, Brosnan ME, *et al.*. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. Biochem. J. 1997; **328**: 287-292.
16. Ishii, I., N. Akahoshi, *et al.*. Murine cystathionine gamma lyase complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem. J.* 2004;**381**: 113–123.
17. Issa K, Kimmoun A, Collin S, Ganster F, Fremont-Orlowski S, Asfar P, Mertes PM, Levy B. Compared effects of inhibition and exogenous administration of hydrogen sulphide in ischaemia-reperfusioninjury. Crit Care. 2013 Jul 10;17(4):R129.
18. Justin X.G. Zhu, Melanie Kalbfl eisch, Yi Xin Yang, Relka Bihari , Ian Lobb, Michael Davison, Amy Mok, Gedaminas Cepinskas, Abdel-Rahman Lawendy and Alp Sener. Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *B J U International* 2012;110, E1218–E1227
19. Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of vasodilatory shock. N Engl J Med 2001, 345:588-595.
20. Li, N. Hyperhomocysteinemia Associated With Decreased Renal Transsulfuration Activity in Dahl S Rats. *Hypertension* 2006;47(6): 1094-1100
21. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep. 2007 Jan-Feb;59(1):4-24.

22. Mariggiò MA, Minunno V, Riccardi S, et al: Sulfide enhancement of PMN apoptosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1998; 20:399–408
23. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, et al:Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 2009; 120:888–896
24. Mok YY, Atan MS, Yoke Ping C, Zhong Jing W, Bhatia M, Moochhala S, Moore PK: Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. Br J Pharmacol 2004, 143:881-889.
25. Mok YY, Moore PK: Hydrogen sulphide is pro-inflammatory in haemorrhagic shock. Inflamm Res 2008, 57:512-518.
26. Morrison ML, Blackwood JE, Lockett SL, Iwata A, Winn RK, Roth MB: Surviving blood loss using hydrogen sulfide. J Trauma 2008, 65:183-188.
27. Pryor WA, Kendall N. Houk, Christopher S. Foote, Jon M. Fukuto, Louis J. Ignarro, Giuseppe L. Squadrito,4 and Kelvin J. A. Davies. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R491–R511, 2006.
28. Rolf Rossaint, Bertil Bouillon, Vladimir Cerny, Timothy J Coats, Jacques Duranteau, Enrique Fernández-Mondéjar, Beverley J Hunt, Radko Komadina, Giuseppe Nardi, Edmund Neugebauer, Yves Ozier, Louis Riddez, Arthur Schultz, Philip F Stahel, Jean-Louis Vincent and Donat R Spahn. Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. *Critical Care* 2010, **14**:R52
29. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, et al: Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2011; 35:156–163
30. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C: Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. Shock 2009, 31:267-274.
31. Stipanuk, MH and Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* 1982;**206**: 267-277.
32. Szabó, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007;**6**(11): 917-935.
33. Tang G, Lingyun Wu, Wenbin Liang, and Rui Wang. Direct Stimulation of KATP Channels by Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide in Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol Pharmacol* 2005;68:1757–1764.
34. Thurston G, Rudge JS, loffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Nat med 2000 ; 6 : 460-3.

35. Tripatara, P., N. Sa Patel, *et al.*. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine γ-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory Investigation* 2008; **88**(10): 1038-1048.
36. Van de Louw A, Haouzi P: Oxygen deficit and H2S in hemorrhagic shock in rats. Crit Care 2012, 16:R178.
37. Wagner, F., P. Asfar, *et al.*. Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide – the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Critical Care* 2009; **13**(3): 213.
38. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;**16**: 1792-1798.
39. Wiggers C. Present status of shock problem. Physiol Rev,1942;22:74-123.
40. Yuan HT, Tipping PG, Li XZ, Long DA, Woolf AS. Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. Kidney International. 2002; 61:2078-2089.
41. Zhao, W., J. F. Ndisang, *et al.*. Modulation of endogenous production of H_2S in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2003;**81**(9): 848-853.
42. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. EMBO J. 2001 Nov 1;20(21):6008-16.

Tables:

Table 1 Hemodynamic measurements

	Groups Time	Before Shock	Shock	Reperfusion	After Reperfusion	
		0’	50’	70’	150’	240’
MAP (mmHg)	CT (n=5)	137 ± 8	136 ± 12*	134 ± 10*	126 ± 5*	118 ± 7*
	NaCl (n=15)	120 ± 11	40 ± 1	110 ± 19	98 ± 7	91 ± 3
	NaHS (n=15)	126 ± 13	40 ± 2	121 ± 11	97 ± 10	95 ± 7
	PAG (n=10)	139 ± 12	40 ± 1	116 ± 23	98 ± 9	101 ± 16
HR (bat/min)	CT (n=5)	390 ± 36.74	402 ± 34.21*	402 ± 34.21*	420 ± 21.21*	420 ± 36.74*
	NaCl (n=15)	320 ± 47.66	264 ± 47.03	298 ± 47.39	368 ± 46.01	340 ± 59.64
	NaHS (n=15)	328 ± 40.04	270 ± 46.75	302 ± 46.01	354 ± 39.61	350 ± 44.88
	PAG (n=10)	363 ± 43.47	321 ± 49.09	342 ± 75.10	390 ± 63.25	360 ± 64.81
CBF (mL/min)	CT (n=5)	2.8 ± 1.97	2.04 ±0.65	2.54 ± 1.28	1.38 ± 0.79	1.78 ± 1.03
	NaCl (n=15)	1.87 ± 1,24	0.39 ± 0.23	1.51 ± 0.75	1.43 ± 0.67	2.14 ± 1.39
	NaHS (n=15)	1.99 ± 0,92	0.37 ±0.24	1.97 ± 1.27	1.25 ± 0.53	1.92 ± 1.08
	PAG (n=10)	1.54 ± 0.58	0.39 ± 0.23	2.3 ± 1.59	1.47 ± 0.59	1.675 ± 0.89

Parameters: MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; CBF, carotid blood flow. Groups: control group (CT), hemorrhagic shock-saline group (HS-NaCl), hemorrhagic shock-NaHS group (HS-NaHS) and hemorrhagic shock-PAG group (HS-PAG).

*P <0.05, significantly different from CT group.

Figure legends:

Figure 1: Renal blood flow (RBF). In control group (black circle), hemorrhagic shock (HS)-saline group (white circle), hemorrhagic shock-NaHS group (black square) and hemorrhagic shock-PAG group (white square) rats recorded during 240 minutes monitoring period. Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for CT group, n = 15 rats for HS-NaCl group, n = 15 rats for HS-NaHS groups and n = 10 rats for HS-PAG group. *P <0.05, significantly different between HS-PAG *vs.* HS-NaHS and HS-PAG *vs.* CT

Figure 2: Vascular filling. The amount of intravenous Gelofusine® administrated to maintain MAP constant since reperfusion phase until the end of the experience. Data are expressed as mean ± SD. *P <0.05, significantly different from HS-PAG.

Figure 3: Vascular permeability markers expression. Renal capillary permeability was evaluated by IHC. Data are expressed as mean ± SD. (A) Kidney VEGF expression*P <0.05, significantly different from HS-NaCl group. (B) kidney Ang-1 expression *P <0.05, significantly different from HS-NaCl ans CT groups. (C) kidney Albumin expression *P <0.05, significantly different from CT group.

Figure 4: H2S enzymatic production. The two enzymatic pathway productions of H_2S in kidney were evaluated by IHC. Data are expressed as mean ± SD. (A) Renal CSE expression *P <0.05, significantly different from HS-NaCl and CT groups. (B) Renal CBS expression *P <0.05, significantly different from HS-NaCl group.

Figure 5: Renal Cortical microcirculatory velocities (Vm). In control (black circle), hemorrhagic shock (HS)-saline (white circle), hemorrhagic shock-NaHS (black square) and

hemorrhagic shock-PAG (white square) groups. Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for CT group, n = 15 rats for HS-NaCl group, n = 15 rats for HS-NaHS groups and n = 10 rats for HS-PAG group. *P <0.05, significantly different from HS-PAG group.

Figure 6: Renal function: (A) Plasmatic creatinine, (B) Creatinine clearance and (C) Urine Creatinine analyzed in the end of experiment. Data are expressed as mean ± SD. *P <0.05, significantly different between (A): HS-PAG *vs.* HS-NaHS and HS-PAG *vs.* HS-NaCl (B) and (C): HS-PAG *vs.* all groups.

Figures:

Figure 1

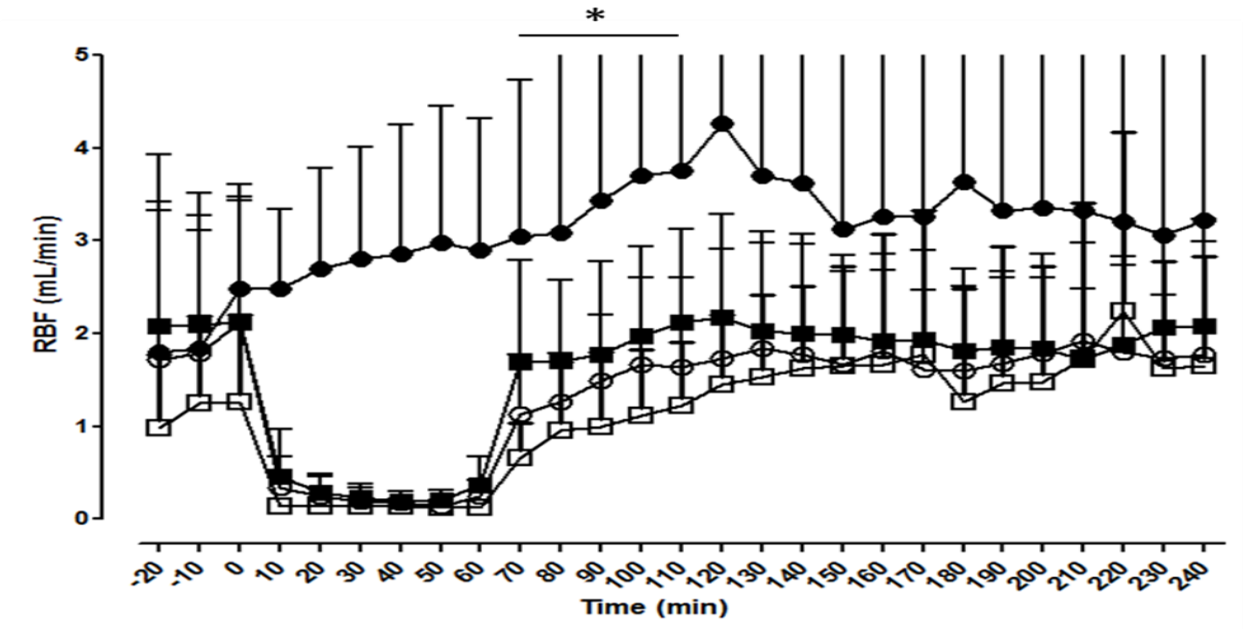


Figure 2

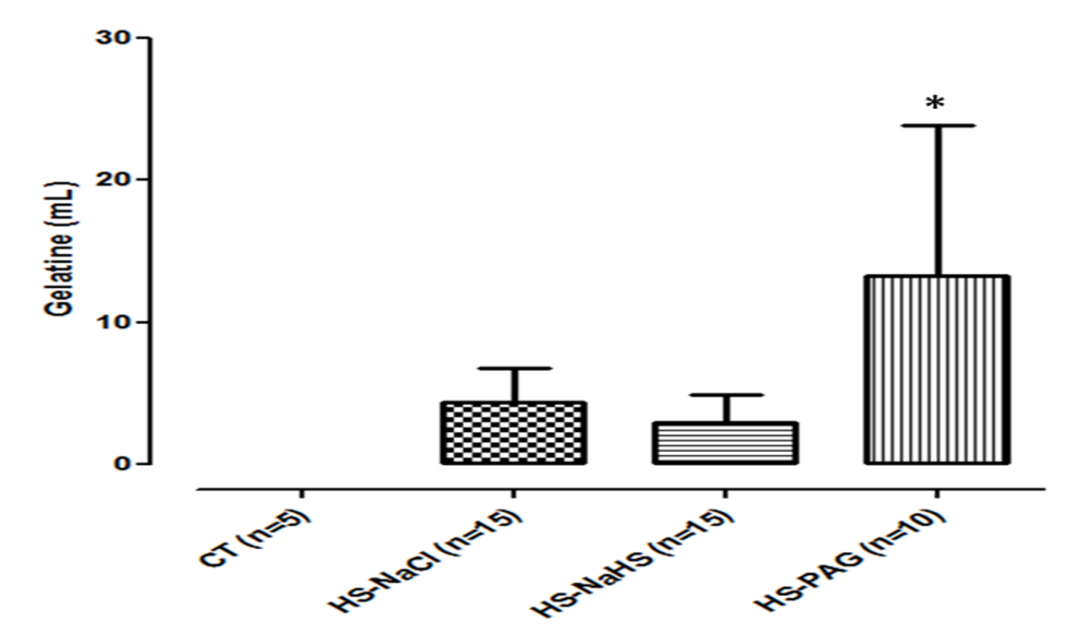


Figure 3

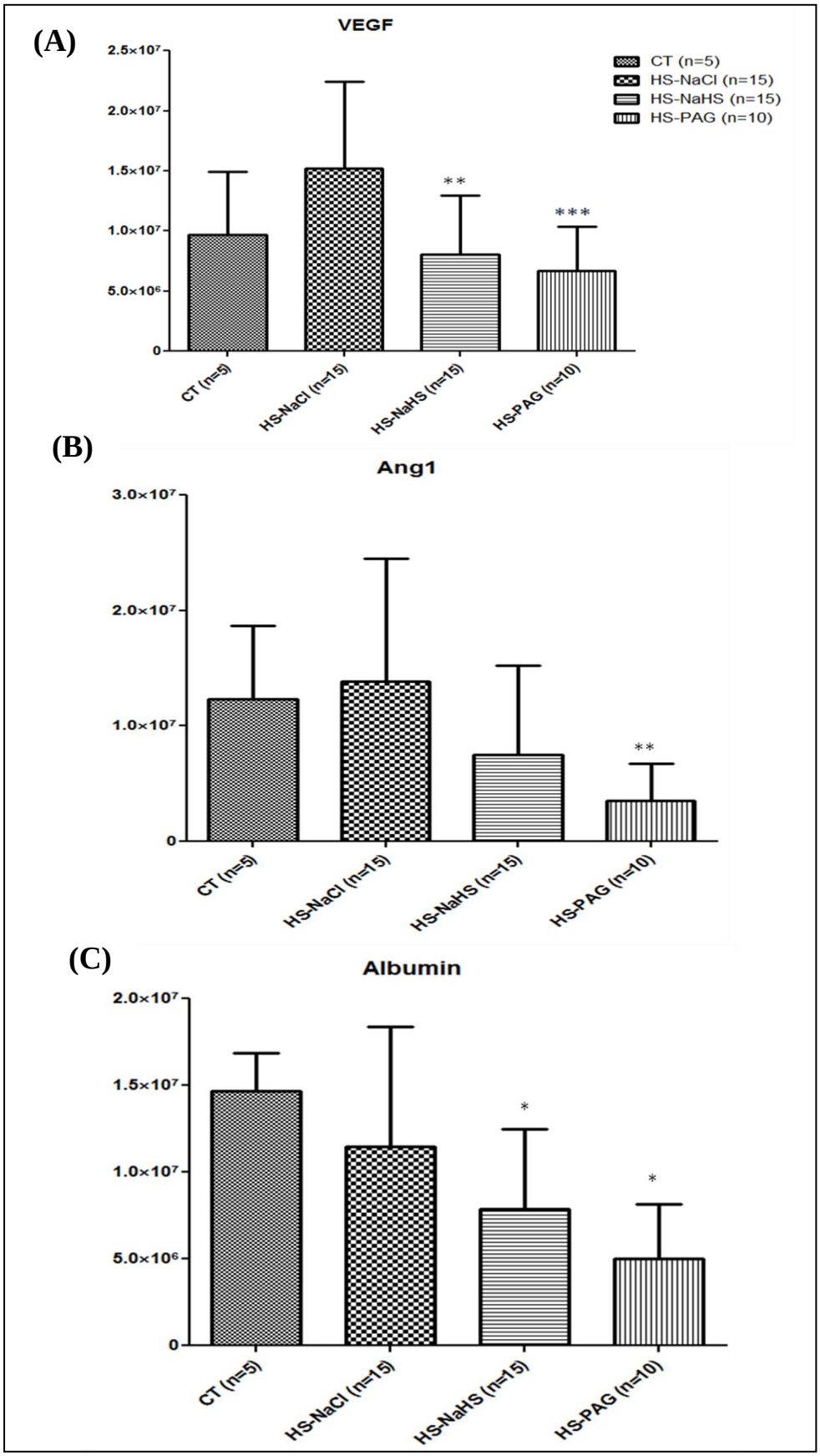

(A)
VEGF
2.5×10⁷
2.0×10⁷
1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
CT (n=5)
HS-NaCl (n=15)
HS-NaHS (n=15)
HS-PAG (n=10)
**
***
(B)
Ang1
3.0×10⁷
2.0×10⁷
1.0×10⁷
0
**
(C)
Albumin
2.0×10⁷
1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
*
*

Figure 4

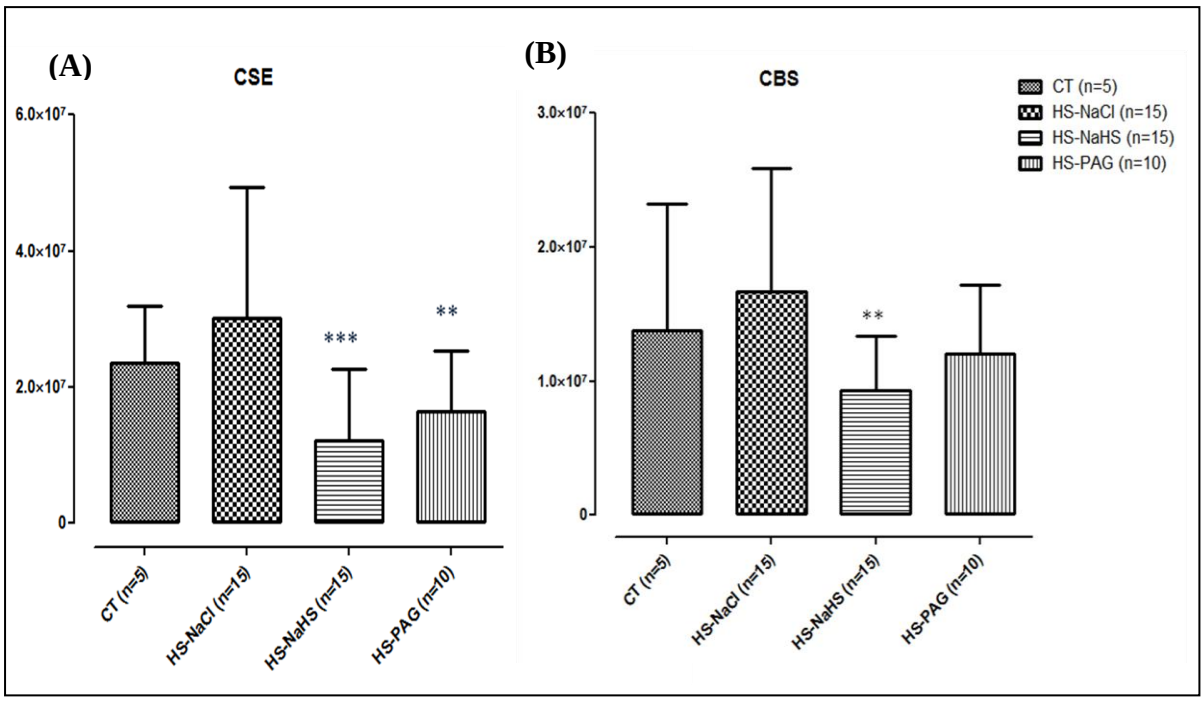


Figure 5

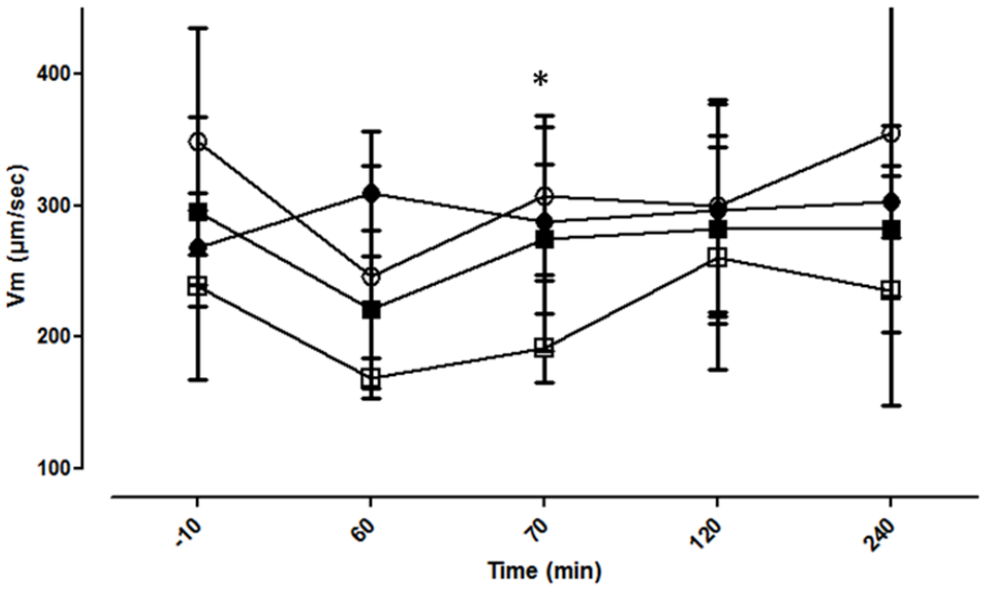
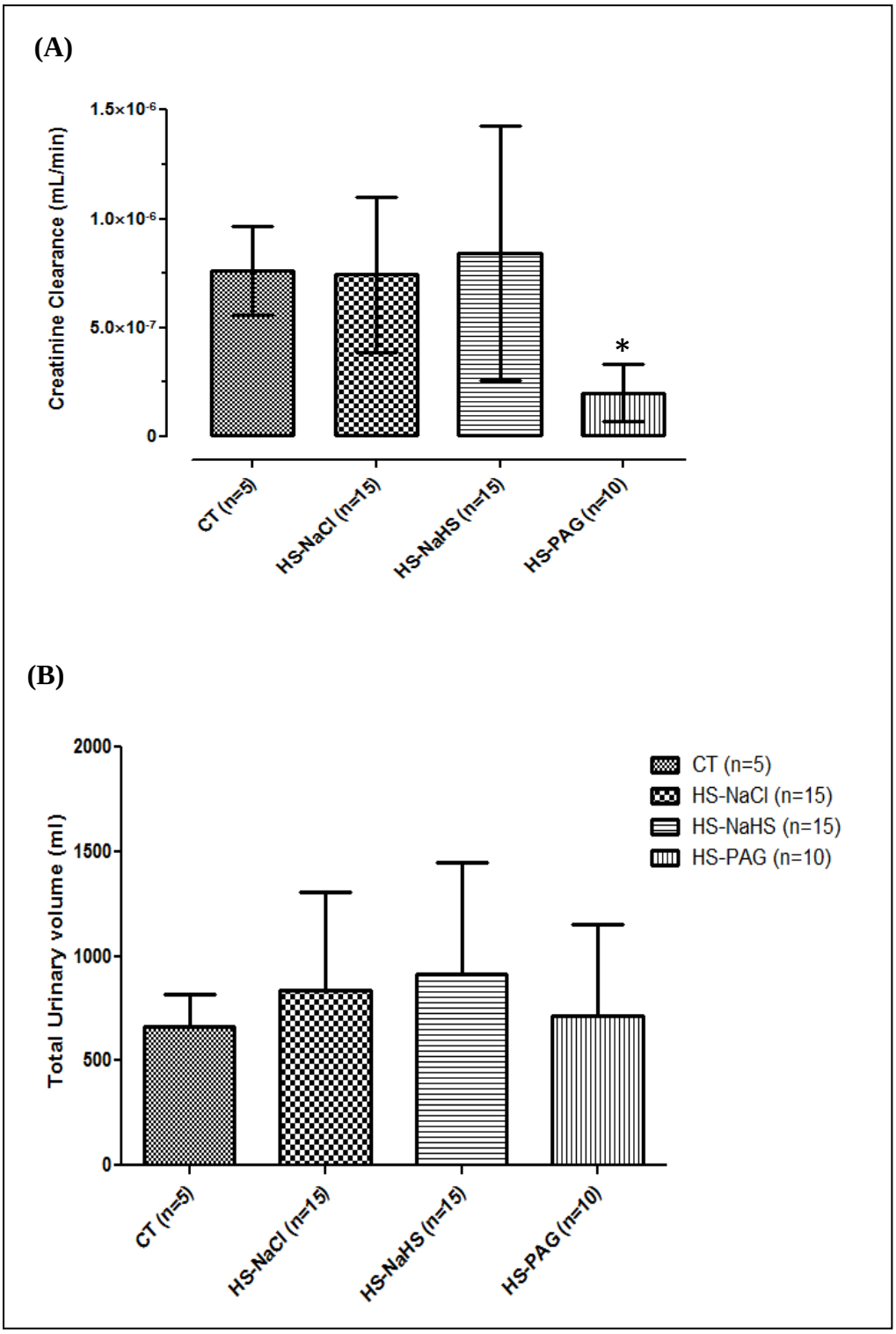


Figure 6:


(A)
Creatinine Clearance (mL/min)
1.5×10-6
1.0×10-6
5.0×10-7
0
*
CT (n=5)
HS-NaCl (n=15)
HS-NaHS (n=15)
HS-PAG (n=10)
(B)
Total Urinary volume (ml)
2000
1500
1000
500
0
CT (n=5)
HS-NaCl (n=15)
HS-NaHS (n=15)
HS-PAG (n=10)
CT (n=5)
HS-NaCl (n=15)
HS-NaHS (n=15)
HS-PAG (n=10)

4. CONCLUSION

Cette étude expérimentale *in vivo* des mécanismes d'I/R suite à un choc hémorragique retransfusé et contrôlé sur le plan hémodynamique par un remplissage vasculaire permettant de maintenir la pression artérielle moyenne et le débit rénale constants indique que l'inhibition de H_2S endogène par le PAG, inhibiteur spécifique de la CSE, est délétère pour la fonction rénale et passe par des mécanismes indépendants des variations hémodynamiques macrocirculatoires. L'inhibition de la production endogène de l'hydrogène sulfuré diminue aussi les vitesses microcirculatoires péritubulaires corticales du rein et est associé à une dégradation de la fonction rénale et à un syndrome de fuite capillaire majoré. L'étude *in vitro* des marqueurs de la perméabilité endothéliale dans le rein par immunohistochimie (IHC), montre que l'inhibition de l'H_2S endogène par le PAG favorise le phénomène de la perméabilité endothéliale par diminution du VEGF et de l'angiopoietine-1 (Ang-1). Ces effets bénéfiques d'H_2S endogène justifient d'autres expérimentations et passe probablement par l'activité enzymatique de CSE dans le rein.

Le bolus de NaHS, donneur d'H_2S exogène, est sans influence sur les vitesses microcirculatoires péritubulaires rénales et sur la fonction rénale dans notre modèle expérimentale. H_2S exogène montre un effet de rétrocontrôle négatif sur l'activité de CSE dans le rein et ceci pourrait expliquer l'effet neutre de l'administration de NaHS sur la fonction rénale.

Cette étude a mis en évidence le rôle vasculaire important de l'H_2S endogène dans la protection contre les lésions d'I/R induites par choc hémorragique. Dans la dernière étude de ma thèse nous avons essayé de mettre en évidence les rôles vasculaires, hémodynamiques, systémiques et splanchniques de deux molécules proposées dans le traitement de la cirrhose.

ETUDE 3 :

Evaluation des effets hémodynamiques de la terlipressine et de la noradrénaline sur l'hémodynamique splanchnique dans la cirrhose chez le rat.

1. LE SYSTEME PORTE

Le système porte est un système vasculaire unique de l'organisme de par son rôle et son anatomie spécifiques. C'est un système comprenant l'ensemble des veines qui drainent le sang veineux du tractus gastro-intestinal, de la rate, du pancréas et de la vésicule biliaire (cf. Figure 31). Le sang drainé par ces viscères est amené vers le foie par la veine porte. En plus du sang provenant par le système porte qui représente 70% de l'apport du flux sanguin hépatique total, le foie reçoit un deuxième apport sanguin par l'artère hépatique et qui ne représente que 30% de cet apport. Le sang portal est ensuite relié à la circulation systémique via les veinules hépatiques et les veines sus-hépatiques. Le sang provenant des organes digestifs est collecté par la veine mésentérique supérieure et la veine splénique qui s'unissent pour former la veine porte.

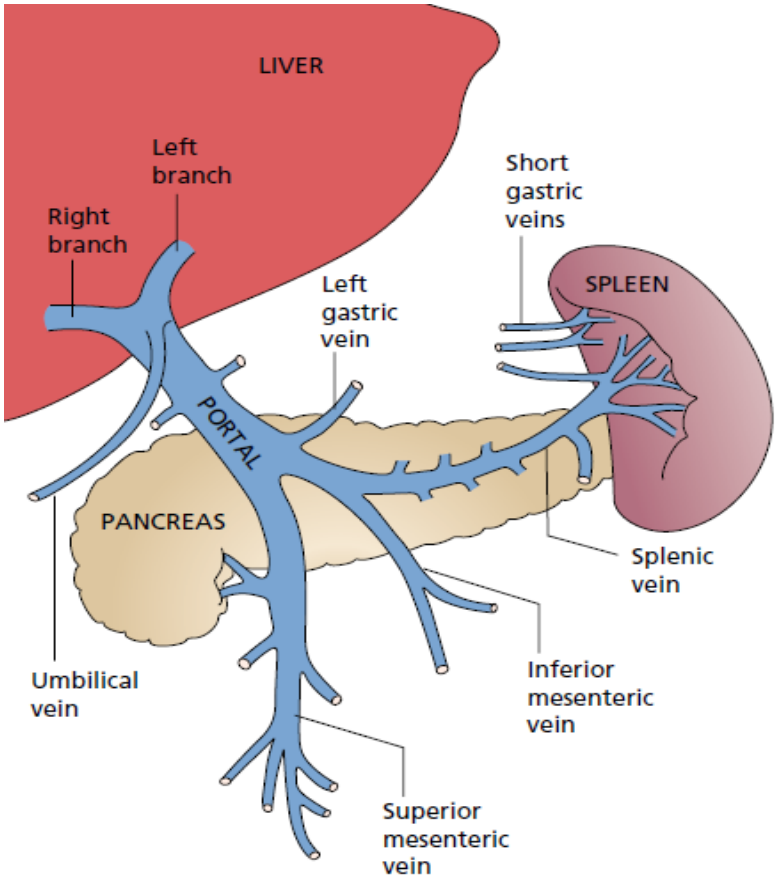


Figure 31: Anatomie du système porte veineux
(Burroughs *et al.*, 2011)

- **La veine mésentérique supérieure** reçoit plusieurs affluents : les veines iléales, iléo-coliques, coliques droites et coliques transverses, les veines gastriques et les veines

duodéno-pancréatiques antéro-inférieures. Elle remonte dans le mésentère à droite de l'artère vers le confluent porto-mésentérique au niveau duquel elle forme avec le tronc spléno-mésaraïque le tronc porte.

- **Le tronc spléno-mésaraïque** est composé de plusieurs veines :
  - La veine mésentérique inférieure qui draine le rectum et le sigmoïde ainsi que la partie ascendante du colon par les veines rectales supérieures, les veines sigmoïdes et les veines coliques gauches respectivement.
  - La veine splénique qui draine la rate à partir du hile splénique où elle reçoit les petites veines gastriques de l'estomac ainsi que les veines pancréatiques.
- **La veine porte** est la continuité de la veine splénique et de la veine mésentérique supérieure. Chez l'adulte, cette veine est dénuée de valves ce qui explique que le flux veineux est déterminé par le gradient de pression dans le système porte. Ainsi une obstruction au niveau de la veine porte, comme dans le cas de la cirrhose, peut entrainer une augmentation du flux sanguin ainsi qu'une inversion du flux sanguin formant des anastomoses entre le système porte et le système systémique spontanées dans les sites suivants (cf. Figure 32) :
  - Veines gastriques et veine cave supérieure
  - Veine mésentérique inférieure et veine cave inférieure
  - Veines paraombilicales et sus-cutanées
  - Veines rétropéritonéales et veines cave et azygos

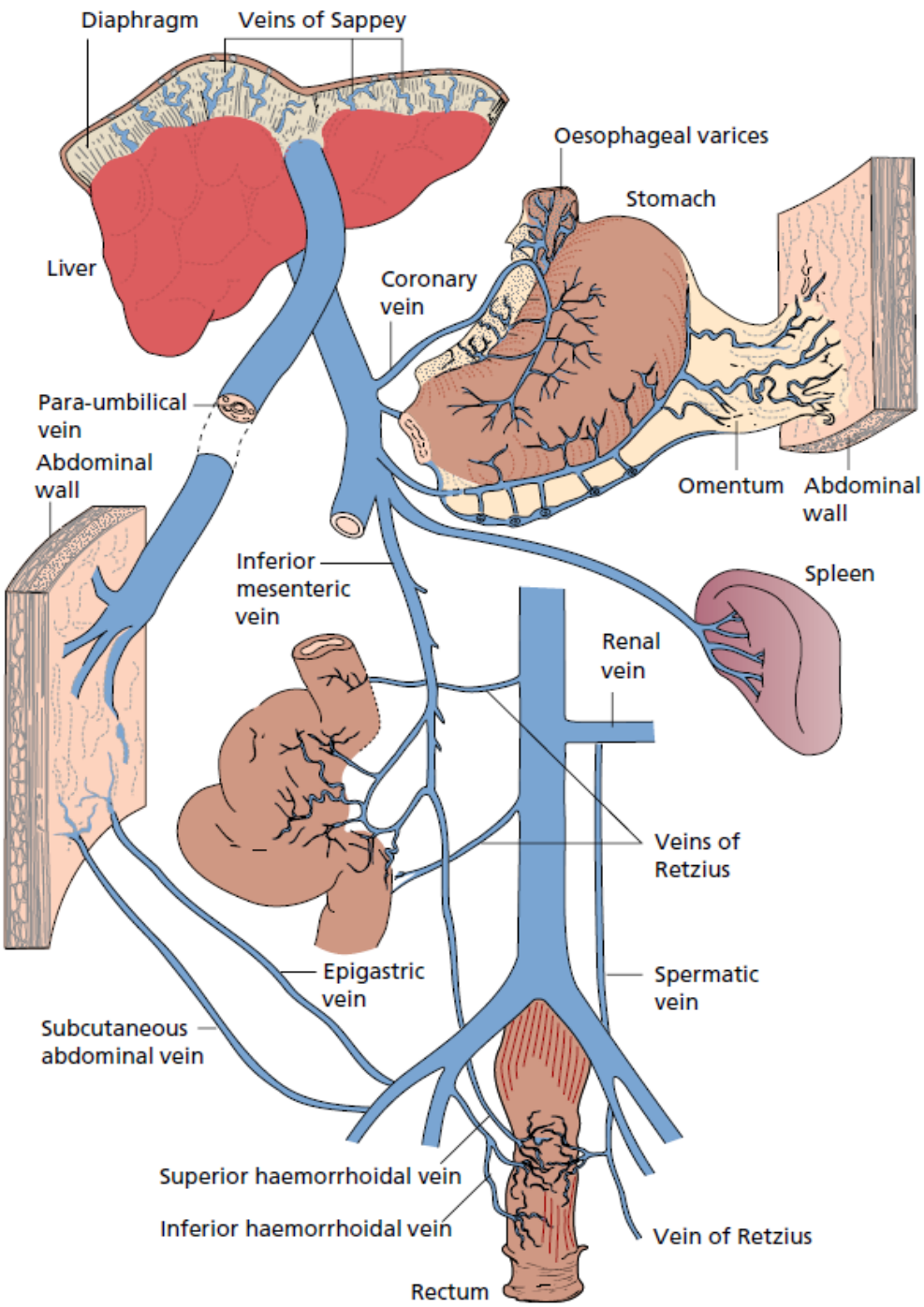


Figure 32: Les sites des anastomoses porto-systémique dans la cirrhose
(Burroughs *et al.*, 2011)

1.1. Physiologie de la circulation splanchnique

Le volume sanguin splanchnique représente 30% de la masse sanguine totale (Granger, Richardson *et al.* 1980). Ce volume sanguin est reparti en 30% de sang artériel pour 70% de sang veineux. En moyenne, 25% du débit cardiaque est attribué au territoire splanchnique. La circulation splanchnique se caractérise par des possibilités d'adaptation face à des situations physiologiques (hyperhémie lors de la phase de digestion) ou pathologiques (cirrhose, établissement d'une circulation collatérale, vasoconstriction lors des états de choc pour préserver les organes nobles).

Chez le sujet sain, les variations hémodynamiques systémiques participent activement à la régulation du flux splanchnique. La régulation du flux splanchnique est sous la dépendance d'un système intrinsèque et extrinsèque. La régulation intrinsèque comporte une modulation du tonus artériolaire d'origine métabolique (vasodilatation) et un contrôle myogénique (vasoconstriction en réponse à une augmentation de la pression artérielle). La régulation extrinsèque comprend quant à elle l'action vasoconstrictrice du système sympathique et l'action de substances vaso-actives médiées par les récepteurs adrénergiques de type alpha et bêta. Ces systèmes d'autorégulations sont comparables à ceux retrouvés au niveau rénal (détaillé dans le chapitre II), mais d'efficacité moindre (Takala, 1996).

1.2. En situation pathologique

Dans des situations pathologiques et plus précisément dans le cas d'hypertension portale induite par cirrhose, la circulation splanchnique perd son système de régulation à cause de la vasodilatation systémique et splanchnique. L'augmentation des vasodilatateurs circulants comme le NO, le glucagon et la prostacycline (PGI_2) (Champigneulle *et al.,* 1991 ; Lee *et al.,* 1992 ; Stark *et al.,* 1992) induit un état d'hyporéactivité vasculaire dans le système porte. Ainsi, l'inhibition de la NO ou de PGI_2 au cours de la cirrhose ou l'hypertension portale inverse les effets vasodilatateurs sur la circulation systémique et splanchnique (Pizcueta *et al.,* 1992) et favorise la réactivité vasculaire aux vasoconstricteurs (Lee *et al.,* 2001). La diminution de la sensibilité aux vasoconstricteurs a été montré chez les patients avec cirrhoses (Ryan *et al.,* 1993), ainsi que chez les animaux dans des études *in vivo* (Finberg *et al.,* 1981 ; Kiel *et al.,* 1985 ; Hartleb *et al.,* 1994) et *in vitro* (Castro *et al.,* 1993 ; Bomzon *et al.,* 1987 ; Sieber *et al.,* 1992). Le phénomène induisant cette hyporéactivité est mal connu. Les difficultés à effectuer des études expérimentales chez l'homme expliquent les lacunes

concernant la physiopathologie de ce système. Afin d'expliquer les origines de cette hyporéactivité face aux vasoconstricteurs, plusieurs études ont développé des modèles d'hypertension portale pre- (PVL : *portal vein ligation*) et intra-hépatique (CBDL : *common bile duct ligation*, CCl_4 : *carbon tetrachloride induced cirrhosis*). Ainsi, l'hyporéactivité de l'artère mésentérique supérieure spécifique du système adrénergique pourrait être causée par une régulation négative génétique ou par régression du nerf sympathique (Coll *et al.*, 2008 and Coll *et al.*, 2010). L'augmentation du taux des vasodilatateurs circulants, suite à une endotoxemie associée à la cirrhose ou à l'hypertension portale, a été aussi montré comme la principale cause de l'hyporéactivité vasculaire des rats avec une hypertension portale (Lee *et al.*, 2001 ; Castro *et al.*, 1993 ; Claria *et al.*, 1992).

Malgré cette hyporéactivité aux vasoconstricteurs, la terlipressine (TP) reste le premier traitement pharmacologique au cours des complications de la cirrhose. Récemment, la noradrénaline (NE) a été proposée comme alternative sécurisée et efficace dans le traitement du syndrome hépatorénal (SHR).

2. LA TERLIPRESSINE

2.1. Historique

La terlipressine a été approuvée au début des années 1980 en Allemagne pour le traitement des patients atteints d'hémorragie des varices œsophagiennes. Les produits contenant de la terlipressine ont été commercialisés en Europe, en Amérique du Sud et en Asie pour le traitement de l'hémorragie des varices œsophagiennes. La terlipressine est également approuvée pour le traitement du SHR en France, Inde, Irlande, Mexique, Portugal, Corée du Sud, Taiwan et Espagne.

2.2. Pharmacologie

La vasopressine endogène est une arginine-vasopressine (AVP), un nanopeptide avec de l'arginine en position 8 (cf. Figure 33). La lysine-vasopressine (LVP) est un peptide vasopresseur du porc avec de la lysine en position 8. La terlipressine est un analogue synthétique de la lysine-vasopressine. La TP agit comme un pro-médicament pour la lysine-vasopressine (acétate de N-alpha-triglycyl-8-lysine vasopressine). Cette substance est composée de 3 résidus glycyl et de lysine vasopressine, qui est biologiquement inactif sous

cette forme. La durée d'action de la terlipressine est plus longue que la vasopressine et est due à un clivage enzymatique progressif des 3 résidus glycyl N-terminaux de la terlipressine par diverses endopeptidases au niveau du rein, ce qui entraîne la libération progressive de la LVP, métabolite pharmacologiquement actif (Vosmik *et al.,* 1977 ; Valla *et al.,* 1985). La TP est considérée comme un puissant vasoconstricteur systémique et splanchnique via le récepteur V1 de la vasopressine.

Il y a quatre récepteurs connus qui se lient avec une affinité importante à la vasopressine V1a: (vasopresseur), V1b (hypophyse), V2 (rénale) et OT (ocytocine; utérine). Les récepteurs V1a sont exprimés dans le foie, le muscle lisse vasculaire, le cerveau et dans de nombreux autres tissus. Dans le système vasculaire, les récepteurs V1a induisent une vasoconstriction en réponse à la liaison de la vasopressine. Les récepteurs V1b dans l'hypophyse antérieure stimulent la libération de l'ACTH par l'AVP tandis que les récepteurs V2 se trouvent dans le tube collecteur du rein où ils favorisent l'action antidiurétique de l'AVP. Les récepteurs d'ocytocine (OT) sont exprimés dans l'utérus, la glande mammaire, l'ovaire et dans plusieurs autres tissus. Les récepteurs OT provoquent la vasoconstriction des vaisseaux utérins.

Dans les complications de cirrhose, l'effet recherché de la terlipressine est la stimulation des récepteurs V1a qui sont exprimés à la surface des cellules musculaires lisses artérielles splanchnique (Moreau *et al.,* 2006). L'engagement des récepteurs V1a induit une vasoconstriction artériolaire splanchnique très marquée, ce qui entraîne une augmentation du volume artériel, augmentation de la pression artérielle et la normalisation des systèmes vasoconstricteurs endogènes aboutissant à une amélioration du débit sanguin rénal et rétablissement de la fonction rénale.

Ainsi, en raison de sa durée d'action plus longue (jusqu'à 8 heures, par rapport à la durée d'action de quelques minutes de l'arginine vasopressine ou de la lysine vasopressine à dose équivalentes), à son activité surtout V1 vasopressine et à son absence d'effet antidiurétique, cette molécule est utilisée dans les situations cliniques où l'on recherche surtout un effet vasoconstricteur splanchnique.

H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr^{5}-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro^{10}-Lys-Gly-NH_2

Free Base

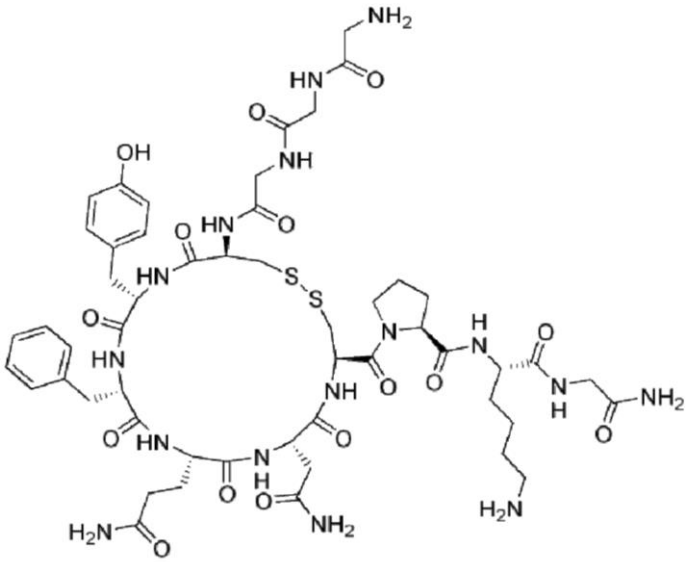


Figure 33: La structure chimique de la terlipressine
(Kumar *et al.,* 2010)

2.3. Effets hémodynamiques de la terlipressine

Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer les effets hémodynamiques de la terlipressine. Cliniquement, les perturbations hémodynamiques chez les patients avec une cirrhose et HTP se résument en une circulation hyper dynamique avec une augmentation du débit et de la fréquence cardiaques, ainsi qu'une diminution de la pression artérielle moyenne et des résistances vasculaires (Bosch *et al.,* 1992 ; Moller, 1998). Ceci est secondaire à une vasodilatation périphérique artérielle et splanchnique, aboutissant à une diminution du volume effectif de sang circulant et donc de la pression artérielle centrale et provoquant l'activation des systèmes régulateurs. La TP induit une vasoconstriction artériolaire responsable d'une baisse de la pression porte et une augmentation significative de la résistance vasculaire systémique, de la pression artérielle moyenne et des pressions auriculaires droites et pulmonaires, ainsi qu'une diminution significative du débit et de la fréquence cardiaques (Escorsell *et al.,* 1997 ; Moller *et al.,* 2000).

La terlipressine entraîne une diminution de la pression hépatique bloquée et du gradient de pression hépatique en induisant une vasoconstriction artériolaire splanchnique, ce qui reflète la diminution de la pression porte (Freeman *et al.,* 1988 ; Vachiery *et al.,* 1996). Les différentes études ont montré une diminution entre 16 et 32% du gradient de pression veineuse hépatique (Pockros *et al.,* 1986 ; Valla *et al.,* 1985 ; Freeman *et al.,* 1988). Plusieurs

données ont associé un traitement vasodilatateur (dérivés nitrés) à la vasopressine ou à la terlipressine chez les patients atteints de cirrhose en raison des effets secondaires décrits, comme une HTA, une bradycardie ou une ischémie myocardique (Groszmann *et al.,* 1982 ; Moreau *et al.,* 1992 ; Levacher *et al.,* 1995).

Les modèles expérimentaux utilisés, pour les maladies touchant le foie avec une hypertension portale induite ou une cirrhose, sont généralement considérés comme des modèles pour les maladies hépatiques en phase terminale. Le dysfonctionnement de la circulation splanchnique ressemble à celui observé chez les patients atteints de la maladie du foie et les changements dans la manipulation du sodium et de l'eau par les reins sont similaires à ceux observés dans un stade tardif chez les patients atteints d'un SHR. Dans ces modèles, la TP diminue la pression de la veine porte et du débit sanguin artériel mésentérique supérieur, et induit l'augmentation de la pression artérielle moyenne et la résistance périphérique totale (Lee *et al.,* 2001 ; Chang *et al.,* 1999 ; Bernadich *et al.,* 1997 ; Huang *et al.,* 1997). Un effet cardiodépressif (diminution du rythme et du débit cardiaque) a également été observé (Chang *et al.,* 1999 ; Huang *et al.,* 1997).

La TP donnée pendant la phase hémorragique était moins efficace que lorsqu'elle est administrée pendant un état stable de l'hypertension portale expérimentale ou une cirrhose (Lee *et al.,* 2001). Cette hyporéactivité splanchnique a été associée à une surexpression constitutive de NO synthétase et cyclo-oxygénase 1 dans l'artère mésentérique supérieure et une augmentation de la libération de glucagon due à la rétention de sang dans l'estomac. Bien que la réponse splanchnique ait été diminuée pendant les hémorragies, les réponses systémiques à la terlipressine (augmentation de la pression artérielle moyenne et diminution du débit cardiaque) ont été maintenues.

2.4. Au cours des hémorragies digestives

L'efficacité du traitement avec la terlipressine a été montrée en comparaison aux différentes modalités thérapeutiques pour l'hémorragie digestive (Ioannou *et al.,* 2001) : tamponnade par ballon (Fort *et al.,* 1990 ; Garcia *et al.,* 1997), traitement endoscopique (Escorsell *et al.,* 2000), ou traitement pharmacologiques (octréotide, somatostatine (Feu *et al.,* 1996 ; Walker *et al.,* 1996), vasopressine). Ces études indiquent que la terlipressine est considérée comme le traitement le plus efficace en première intention pour traiter

l'hémorragie digestive et éviter les récidives hémorragiques chez les malades atteints de cirrhose pour réduire la mortalité et la durée de l'hospitalisation.

2.5. Au cours du syndrome hépato-rénal

Il s'agit d'une insuffisance rénale aiguë, fonctionnelle qui se développe chez des malades ayant une insuffisance hépatique avancée sur une cirrhose décompensée (Moreau *et al.,* 2002). L'insuffisance rénale est due à une vasoconstriction rénale secondaire à une hyperactivité du système vasoconstricteur. L'activation du système vasoconstricteur est la conséquence d'une vasodilatation artériolaire splanchnique résultante de l'hypertension portale au cours de la cirrhose (Moreau *et al.,* 2006). En fait, les substances qui sont produites en excès (noradrénaline, angiotensine II) pendant la rétention hydro-sodée sont non seulement anti-natriurétiques mais aussi vasoconstrictrices pour les artérioles extra-splanchniques, rénales et « non rénales ». Il en résulte une vasoconstriction intense dans la circulation rénale et dans d'autres territoires à l'exception du territoire splanchnique qui reste très « dilaté ».
Plusieurs études cliniques ont évalué les effets de la TP sur des patients atteints par un SHR. Ces études ont montré la réversibilité du SHR avec cette thérapeutique, en améliorant la diurèse ainsi que la clairance de la créatinine (Hadengue *et al.,* 1995). La TP augmente la filtration glomérulaire sans effets secondaires (Hadengue *et al.,* 1998). Par ailleurs elle diminue la concentration de la rénine et de l'aldostérone plasmatique et augmente la concentration plasmatique de la vasopressine. La TP augmente la chance de survie avant une transplantation hépatique, chez les patients atteint d'un SHR avec une amélioration significative de la fonction rénale et de l'hémodynamique systémique (Solanki *et al.,* 2002 ; Moreau *et al.,* 2002).

Le traitement combiné de la terlipressine avec l'albumine a abouti à une amélioration significative de la fonction rénale, une augmentation de la concentration plasmatique de sodium, de la pression artérielle, de la pression veineuse centrale ainsi qu'une suppression de l'activité du système rénine angiotensine et sympathique, plus important qu'avec la terlipressine seule (Ortega *et al.,* 2002). L'albumine semble donc améliorer de façon significative les effets bénéfiques de la TP lorsqu'elle est combinée à ce dernier traitement.
L'efficacité de la TP sur les modèles expérimentaux n'a pas encore été testée à cause du manque de modèle animal qui produit tous les signes pathologiques du SHR observés chez l'homme.

Des études randomisées suggèrent que l'administration de noradrénaline est aussi efficace que celle de terlipressine pour améliorer la fonction rénales es malades avec un SHR (Alessandria *et al.,* 2007 ; Sharma *et al.,* 2008 ; Singh *et al.,* 2012 ; Gosh *et al.,* 2013).

3. LA NORADRENALINE

Parmi les vasoconstricteurs proposés pour le traitement des complications de la cirrhose, la NE a été proposée par quelques études effectuées chez l'homme (Duvoux *et al.,* 2002 ; Alessandria *et al.,* 2007 ; Sharma *et al.,* 2008 ; Singh *et al.,* 2012 ; Gosh *et al.,* 2013) ou chez le rat (Coll *et al.,* 2012 ; Chang *et al.,* 2005) comme une molécule efficace pour modérer l'hypertension portale. L'avantage de cette molécule est qu'elle possède des effets différents suivant les tissus. Au niveau des vaisseaux, l'effet de cette molécule est déterminé selon la balance entre les effets vasoconstricteurs α-adrénergiques et vasodilatateurs β-adrénergiques (cf. Tableau 3). Ainsi, en cas d'hypertension portale, on observera une vasoconstriction périphérique et une vasodilatation au niveau splanchnique diminuant la pression au niveau de la veine porte. La stimulation des récepteurs α-adrénergiques par la NE résulte en une vasoconstriction artériolaire splanchnique qui pourra normaliser la redistribution du volume sanguin artériel et maintenir la perfusion des organes extra-splanchniques, essentiellement le rein. Par contre, l'activité α-adrénergique prédominante de la NE induisant une vasoconstriction artériolaire afférente suite à la stimulation du récepteur α_1 adrénergique pourrait être aussi la cause d'une aggravation de l'hypoperfusion rénale. Ces effets contradictoires théoriques de la NE ont été la cause dans l'abstention de l'utilisation thérapeutique de cette molécule. Sur le plan pratique, une amélioration de la circulation et de la fonction rénale a été montré dans des études cliniques par l'augmentation de la PAM et de la clairance de la créatinine et la diminution de l'activité du système rénine angiotensine chez des patients atteints par SHR 1 (Duvoux *et al.,* 2002 ; Sharma *et al.,* 2008 ; Singh *et al.,* 2012) et SHR 2 (Alessandria *et al.,* 2007 ; Ghosh *et al.,* 2013). L'amélioration de la perfusion rénale décrite après un traitement avec la NE reflète une diminution de la pression porte et une normalisation du débit sanguin splanchnique. Ces effets sur le territoire splanchnique a été mise en évidence dans des modèles expérimentaux d'hypertension portale avec ou sans cirrhose. Ainsi, la NE induit une diminution du débit sanguin de l'artère mésentérique et portale (Coll *et al.,* 2012).

A l'inverse des effets cardiodépresseurs de la TP, la noradrénaline interagit avec les récepteurs β1 pour augmenter la fréquence cardiaque (action chronotrope positive) grâce à la diminution de la période de dépolarisation diastolique, et pour augmenter la force de contraction du cœur (action inotrope positive) par une action ventriculaire. Bien que cette molécule entraîne une vasoconstriction artérielle périphérique α-adrénergique, l'affinité pour les récepteurs β2 (et β1 et β3) de l'adrénaline provoque la dilatation des vaisseaux sanguins du cœur, du cerveau et des muscles squelettiques. Ceci provoque une diminution de la pression diastolique par chute de la résistance vasculaire. Cependant, la pression moyenne est peu modifiée et le débit cardiaque augmente grâce à l'augmentation de la fréquence cardiaque.

Tissu cible	Type de récepteur	Réponse obtenue
Foie	β_2	Glycogénolyse, lipolyse, néoglucogenèse.
Tissu adipeux	β_2	Lipolyse
Muscles squelettiques	β_2	Glycogénolyse.
Pancréas	α_2	Diminution de la sécrétion d'insuline
	β_2	Augmentation de la sécrétion d'insuline
Système cardiovasculaire	β_1	Augmentation de la fréquence cardiaque, de la contractibilité, de la vitesse de conduction.
	α	Vasoconstriction.
	β_2	Vasodilatation des artérioles des muscles squelettiques, des artères coronaires et de toutes les veines.
Muscles bronchiques	β_2	Relaxation.
Tractus gastrointestinal	β_2	Diminution de la contractibilité.
Vessie	α	Contraction des sphincters.
	β_2	Relaxation du muscle détruseur.
Utérus	α	Contraction.
	β_2	Relaxation.
Organes génitaux mâles	α	Ejaculation, détumescence.
	β_2	Erection?
Yeux	α_1	Contraction du muscle radial.
	β_2	Relaxation du muscle ciliaire.
Système nerveux central	α	Stimulation.
Peau	α	Piloérection, production de sueur.
Sécrétion de rénine	β_1	Stimulation.

Tableau 3: Effets des catécholamines en fonction du tissu concerné
(Hedge et al., 1987)

4. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Chez les patients cirrhotiques, l'HTP est associée à des complications graves, comme l'hémorragie des varices œsophagiennes et le syndrome hépatorénal (SHR). Le but du traitement du SHR est d'augmenter le débit rénal soit indirectement par vasoconstriction splanchnique ou directement par une vasoconstriction rénale. Suite à une vasoconstriction artérielle bien marquée sur les territoires splanchniques, le traitement avec des molécules vasoconstrictrices est l'alternative pharmacologique la plus adoptée avant une transplantation hépatique, qui reste le traitement de choix. Dans ces conditions, la Terlipressine (TP) est le médicament le plus approprié avec le moins d'effets secondaires, en particulier dans le SHR de type 1. A l'inverse de la Noradrénaline (NE), la TP n'est pas disponible dans plusieurs pays et est coûteuse. Des études récentes ont montré une réversion du SHR avec la NE. Cependant les effets hémodynamiques splanchnique de la NE sont mal connus en particulier son effet sur la pression portale dans le contexte de la cirrhose.

Dans notre étude expérimentale nous avons reproduit le modèle d'hypertension portale intra-hépatique sinusoïdale avec cirrhose biliaire induite par une ligature et ponction du canal cholédoque (BDL) chez le rat. 4 semaines après la procédure chirurgicale, les rats sont répartis en quatre groupes, dont deux groupes BDL et deux groupes SHAM qui se divisent selon le traitement subi (TP ou NE). *In vivo*, l'étude des paramètres hémodynamiques (pression artérielle moyenne, fréquence cardiaque, débit carotidien, débit de l'artère mésentérique supérieure et pression de la veine porte) et *in situ* la réactivité vasculaire de la veine porte, de l'artère mésentérique, de la carotide et de la veine cave sont réalisées dans le but de :

- Evaluer les effets hémodynamiques de la TP au niveau systémique et splanchnique.
- Evaluer les effets hémodynamiques de la NE au niveau systémique et splanchnique, et plus précisément les effets sur l'HTP.
- Comparer le traitement avec la NE à celui de référence, la TP, et leurs effets sur l'amélioration de l'hypertension portale.
- Décrire la réactivité vasculaire de la veine porte et de l'artère mésentérique dans notre modèle face aux deux vasoconstricteurs.
- Déterminer la relation entre les effets circulatoires sur l'hypertension portale et la réactivité vasculaire du territoire splanchnique en présence de ces deux vasoconstricteurs.

5. ARTICLE : "*Systemic and splanchnic hemodynamic effects and splanchnic vascular reactivity of Terlipressin vs Noradrenaline in cirrhotic rats"*

Systemic and splanchnic hemodynamic effects and splanchnic vascular reactivity of Terlipressin *vs* Noradrenaline in cirrhotic rats

Abstract:

Introduction: Vasoconstrictor drugs used for portal hypertension complications aims at decreasing portal pressure. However, several factors related to cirrhosis could limit the use of these drugs. The purpose of the present study was to compare the effects of the two most used vasoconstrictors in cirrhosis complications, terlipressin (TP) and norepinephrine (NE), on hemodynamic and vascular reactivity of common bile duct-ligated (BDL) cirrhotic rats.

Methods: Studies were performed 4 weeks after the onset of BDL on Sprague Dawley rats. Measure mean arterial pressure (MAP), carotid blood flow (CBF), heart rate (HR), superior mesenteric arterial blood flow (SMABF) and portal vein pressure (PVP) were continuously monitored after increasing incremental doses infusion for TP and NE groups (0.5; 1; 2; 3; 4 µg/kg/min and 10; 20; 30; 40; 50 µg/kg/min respectively). Vascular reactivity of portal vein, mesenteric artery, carotid and vena cava was studied on a wire myograph to determine the concentration-response curves of NE (10^{-8} M to 5 10^{-5} M) and vasopressin (10^{-9} M to 3 10^{-6} M).

Results: Drugs infusion *in vivo* cirrhotic animals showed that TP and NE increase mean arterial pressure with different effects on splanchnic hemodynamics. NE increases the portal venous pressure, at low doses, and is more efficient than vasopressin on the portal veins of

cirrhotic rats *in vitro*. Forevermore, the mesenteric arteries were hyporeactive to NE but not vasopressin. However TP significantly reduces the mesenteric artery blood flow and the portal vein pressure. In addition, the affinity of portal vein receptors to vasopressin agonist in cirrhotic animals is significantly higher in comparison to NE.

Conclusion: TP treatment is more potent than NE in cirrhotic rats and have the advantage to reduce the variceal bleeding risk associated with cirrhosis in comparison to adrenergic drugs.

Keywords: cirrhosis, portal hypertension, terlipressin, vasopressin, norepinephrine, vascular reactivity, splanchnic circulation, variceal bleeding.

Introduction:

Pathophysiological disturbances of portal hypertension are related to serious clinical complications such as the formation and rupture of esophageal and/or gastric varices, ascites, hepatic encephalopathy and hepato-renal syndrome. The most frequent cause of portal hypertension is liver cirrhosis. In cirrhosis, the primary factor leading to increase in portal pressure is an enhanced resistance to portal blood flow. The increased intra-hepatic resistance is the result of the disruption of the liver architecture and the increase of the hepatic vascular tone (Orrego et al., 1979; Gupta et al., 1998). However, also an increase in splanchnic blood flow aggravates portal hypertension (Rodriguez-Vilarrupla et al., 2007). The increase in splanchnic blood flow is secondary to a marked arterial splanchnic vasodilation and the opening of collateral circulation (Tsai MH., 2007). Systemic and splanchnic vasodilation is mediated by the local release of potent vasodilators, of which the most important is nitric oxide (Benoit et al., 1984) and/or vascular hyporeactivity to vasoconstrictors. The impaired reactivity to vasoconstrictor systems, such as the sympathetic nervous system (Heller et al., 1999), vasopressin, angiotensin II and endothelin-1, has been demonstrated in patients with cirrhosis (Ryan et al., 1993) and in the mesenteric vascular bed of portal hypertensive and cirrhotic animals *in vivo* (Finberg et al., 1981; Kiel et al., 1985; Castro et al., 1993; Hartleb et al., 1994) as well as *in vitro* preparations (Castro et al., 1993; Bomzon et al., 1987; Sieber et al., 1992a,b). A downregulation or a decreased affinity of the receptors for vasoconstrictors may explain the sustained systemic and splanchnic vasodilation that occurs despite the reflex secretion of vasoconstrictor hormones. Splanchnic vasodilation is responsible for the onset of the hyperdynamic circulatory syndrome. The latter is characterized by increased plasma volume, cardiac output and heart rate, and decreased systemic vascular resistance with low arterial blood pressure (Belendis et al., 2001; Garcia-Tsao et al., 2003).

Several therapeutic strategies for portal hypertension complications aim at decreasing portal pressure by reducing portal inflow. Among these medical treatments, vasoconstrictor drugs showed remarkable results. Vasoconstrictors counteract the splanchnic arterial vasodilation by improving splanchnic and systemic vasoconstriction, increasing the effective circulation volume and, in turn, renal perfusion (Narahara et al., 2009; Hasper et al., 2011). Vasopressin and its analogue terlipressin (TP) are the most widely utilized vasoactive drugs to control active esophageo-variceal bleeding (Gimson et al., 1986; Walker et al., 1986), since they effectively reduce portal pressure and portal blood flow (Merkel et al., 1988). Terlipressin, a long-acting synthetic vasopressin analogue, acts via V1a receptors and causes splanchnic and systemic vasoconstriction. Terlipressin have the favourable advantage of reducing side effects (Lebrec 1994). However, terlipressin is not available in many countries and therapy is expensive. By contrast, it was suggested that apha-adrenergic drugs such as norepinephrine may be also effective in the treatment of cirrhosis complications especially in HRS (Duvoux et al., 2002). Clinical trials compared NE treatment to that of TP indicate that both drugs are safe and effective in improving renal functions in patients with HRS (Alessandria et al., 2007 ; Sharma et al., 2008 ; Singh et al., 2012 ; Gosh et al., 2013). Norepinephrine would have the potential advantage of wider availability and of lower costs. In the other hand, the hyporeactivity to vasoconstrictors shown in portal hypertension could decrease the efficacy of these pharmacological drugs. This phenomenon cannot be assessed in human studies; experimental models of PHT are considered acceptable models for end stage liver disease and allow comprehensive study of physiopathological questions.

Thus, the main aim of this paper was to compare the hemodynamic and splanchnic effects of terlipressin and norepinephrine administrated separately and continuously throw intra-venous catheter in an experimental model of sinusoidal intra-hepatic portal hypertension with cirrhosis (bile duct ligation). In order to evaluate the vascular hyporeactivity to

vasoconstrictors, we assessed the *in vitro* reactivity of the portal vein and mesenteric artery in the presence of NE and TP.

Materials and methods:

The animal protocol was approved by the regional animal ethics committee (CREEA-Nantes, France). The experiments were performed in compliance with the European legislation on the use of laboratory animals.

Animal model:

Adult male Sprague Dawley rats, weighing 277 ± 27 g, were housed with 12-hours light/dark cycles in the animal facility of the University of Angers (France).

Common bile duct ligation (CBDL)-induced liver cirrhosis was used as the portal hypertension experimental model. As previously reported (Lee et al., 1986), CBDL operation was performed under anesthesia with 2% isoflurane delivered in oxygen. The common bile duct was exposed through a midline abdominal incision, and then doubly ligated with 3-0 silk. The first ligature is made below the junction of the hepatic ducts. The second is made above the entrance of the pancreatic ducts. The ligatures were tightened, and the portion of the bile duct between the two ligatures was transected to avoid repermeabilization. The sham-operated group ($n = 10$) had the common bile ducts isolated without ligation or cut. The incision was closed, and the animals were allowed to recover. Further experiments were carried out 4 weeks post surgery. Rats were placed in metabolic cages for urine samples. Blood and urine are collected for the biochemical analysis. Rats that had not overt macroscopic cirrhosis were rejected from study.

Hemodynamic studies:

Hemodynamic studies were performed 4 weeks after surgical procedure. Animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (50 mg/kg of body weight) and placed on a homeothermic blanket system to maintain rectal temperature between 36.8°C and 37.8°C

throughout the experiment. After a local anesthesia with lidocaïne 1% (Lidocaïne® 1 % Astra Zenecca), a tracheotomy was performed. Animals were mechanically ventilated (Harvard Rodent 683 ventilator, Harvard Instruments, South Natick, MA) and oxygen was added in order to maintain a PaO_2 above 100 mmHg. The left carotid artery was exposed, and a transit-time ultrasound flow probe of 2.0 mm (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) was attached to continuously measure carotid blood flow (CBF). A second transit-time ultrasound flow probe was attached to superior mesenteric artery to measure the superior mesenteric artery blood flow (SMABF).

After a local anesthesia, the left femoral artery was canulated both to measure mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). The homolateral femoral vein was canulated for fluid maintenance. The right femoral artery was also canulated to continuously perfuse drugs (terlipressin, or norepinephrine). A fourth catheter was introduced from ileocolic mesenteric artery to reach portal vein for portal vein pressure (PVP) measurement.

Group randomization:

This prospective experimental study randomly allocated rats in 4 groups: Sham + norepinephrine (Sham+NE, n=5), Sham + terlipressin (Sham+TP, n=5), BDL + norepinephrine (BDL+NE n=10) and BDL + terlipressin (BDL+TP, n=10).

Drugs perfusing and experimental model (Figure 1):

After initial 10 minutes stabilization, all rats received the same amount of gelatine (Gelofusine® 4%, B. Braun Medical, Boulogne, France) in order to compensate the fluid loss due to surgical procedure. 10 minutes prior, continuous drug infusion was started via the right femoral arterial catheter connected to syringe pump (Harvard Apparatus 22). Drugs infusion rate was gradually elevated every 20 minutes for terlipressin groups and 10 minutes for

norepinephrine groups (0.5; 1; 2; 3; 4 µg/kg/min and 10; 20; 30; 40; 50 µg/kg/min respectively). Rats were continuously monitored for heart rate (HR), MAP, carotid blood flow (CBF), superior mesenteric artery blood flow (SMABF) and portal vein pressure (PVP) until the end of experiment. Maintenance of fluid was performed with a perfusion of a rate of 0.2 mL every 10 minutes of 0.9% NaCl per hour in all groups. At the end of the experiments, animals were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital.

In vitro myogenic reactivity study

Vascular reactivity of vessel rings was studied on a wire myograph (Danish Myo Technology, Arhus, Denmark) as previously described (Mulvany and Halpern, 1977). 4 weeks after BDL induction, rats were sacrificed by CO_2 gas inhalation. Vessel segments (carotid artery, vena cava, mesenteric artery and portal vein) was dissected carefully from rats and kept cool (5 – 15°C) in physiological salt solution (PSS). Ring segments, 2 mm in length, were mounted between two stainless-steel wires at 37°C in 3 mL organ baths containing PSS with the following composition (in mM): 130 NaCl, 3.7 KCl, 14.9 $NaHCO_3$, 1.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethylsulfonic acid (Hepes), 1.6 $CaCl_2$, 1.2 KH_2PO_4, and 11 glucose. The Ph of the PSS was adjusted to 7.4 with NaOH (1M), and the solution was continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2.

One wire was attached to a fixed support, while the second wire was connected to a moveable holder supporting a tension transducer (Grass FT.03; Grass Instruments, Quincy, Mass.) so hat isometric force measurements could be recorded on a physiograph (Grass SD90). The vessels were equilibrated at an internal circumference for which the wall tension was about 1 mN/mm for veins, 1.5 mN/mm for mesenteric artery and 4 mN/mm for carotid. The artery segments were allowed to recover for 45 min, during which time the PSS was replaced at 15-min intervals. Following this recovery period, three successive contractions in response to

KCl were used to test the maximal contractile capacity of the vessels. After 20-min washout period, the presence of a functional endothelium was assessed by applying ACh (10 μM) in arteries precontracted with PE (10 μM). After 20-min washout period, concentration-response curves to NE (sigma) were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (10^{-8} M to 5 10^{-5} M). Successively washout period until reaching baseline value is carried out carefully in 20 minutes to completely remove the previous molecule. Then vessels were exposed to increasing incremental concentration of vasopressin (10^{-9} M to 3 10^{-6} M). Vasopressin was used in the in situ study because it is the active form of terlipressin. After a latest 20 minutes washout period, a calcium dose-response curve was obtained by increasing concentrations of Ca^{2+} (0.1 mM to 1.6 mM).

Statistical Analysis:

Data were analysed in GraphPad Prism 4.0 Software. For repeated measurements, one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. Difference between groups was tested using a two-way analysis of variance (repeated time measurements and treatments as independent variables). When the relevant F values were significant at the 5% level, further pairwise comparisons were performed using the Dunnett's test for the effect of time and with Bonferroni's correction for the effects of treatment at specific times. The Quantitative data were compared with the Kruskall-Wallis test or Wilcoxon test as appropriate for inter-group comparisons. All values are presented as mean ± SD for n experiments (n representing the number of animals). An associated probability (p value) of less than 5% was considered significant.

Results

Table 1 depicts the biochemical analysis obtained 4 weeks after the onset of BDL in order to assess the liver dysfunction and hyperdynamic circulation in our experimental model of portal hypertension induced by BDL in rats. Rats showed a significant increase in serum biliribin, aminotransferases (ALAT ASAT) and alkaline phosphatise. Our rats showed also a decrease, but not significant, in creatinine clearance level ($p > 0.05$).

All studies (*in vivo* and *in vitro*) were performed after 4 weeks after the onset of BDL:

Study 1. In order to evaluate the specific vasoconstrictor effect of such dose of terlipressine and norepinephrine on systemic and splanchnic territories out of pressure variations, we tried in this study to develop equivalent doses that produce the same effect on MAP. After preliminary studies of doses-responses curves, we were able to produce a uniform hypertensive effect with increasing incremental concentrations of the two drugs, terlipressin and norepinephrine (0.5; 1; 2; 3; 4 µg/kg/min and 10; 20; 30; 40; 50 µg/kg/min respectively). Therefore, by design of our study, there are no significant differences between the MAP of the 4 groups and the same drug concentrations have identical effect on cirrhotic rats and sham operated rats (Fig.1). The maximal effect of TP on MAP was observed at 20 minutes after start infusion, therefore we changed doses every 20 minutes. However, NE showed a faster response effect than TP, for this its doses increased every 10 minutes.

As expected, cirrhosis induces a spontaneous increase in CBF (baseline values) in comparison with sham operated rats. The lowest dose of terlipressin and the norepinephrine (0.5 and 10 µg/kg/min, respectively) reduce the increase in CBF shown by cirrhosis (- 44.6 ± 10.5 % and - 28.3 ± 29.2 %, $P < 0.005$ respectively). Increasing doses of TP and NE further reduce CBF in two groups without significant differences between groups, results are given in Fig.2.

As we can see from Figure 3, NE causes significant increase in HR with the first dose in BDL+NE and SHAM+NE groups (11.2 ± 6.6 % and 24.4 ± 3.9 %; $P < 0.05$ respectively) and maintains the HR elevated with the highest doses. In the other hand, the lowest dose of TP reduces the HR in BDL+TP and SHAM+TP groups (-1.8 ± 6.1 % and -3.1 ± 3.8 %; $P > 0.05$ respectively), and highest doses further decrease the HR in comparison to baseline values in BDL+TP group as well as SHAM+TP group (at 1 µg/kg/min: -14.1 ± 15.9 % and -6.2 ± 3.1%; $P < 0.05$ respectively).

According to Fig.4, all groups drop their SMABF with NE as well as TP. However, TP significantly decrease the SMABF with doses 1 and 2 compared to NE (ANOVA $p = 0.002$). The lowest dose of NE tested, had no significant effect on SMABF in BDL+NE and SHAM+NE groups (1.5 ± 15.3 % and 3.7 ± 22.6 %; $P > 0.05$ respectively).

PVP of BDL rat groups started significantly higher compared to SHAM operated rat groups as illustrated by Fig.5. The lowest dose of NE significantly increased the PVP in BDL and SHAM groups (24.4 ± 12.3 % and 19.2 ± 11.2 %; $P < 0.05$, respectively), however equivalent dose of TP significantly decreased the PVP in BDL and SHAM groups (- 16.9 ± 5.8 % and – 16.3 ± 8.5 %; $P < 0.05$, respectively).

Study 2: In comparison with SHAM+NE group, NE had no significant effect on portal veins, mesenteric arteries, carotids and vena cava of cirrhotic rats with all doses. However, vasopressin (AVP) significantly increased the portal veins of BDL rats group compared to SHAM rats group with no effects on mesenteric arteries, carotids and vena cava (Fig.6).

Both NE and AVP significantly increased maximum contraction of portal vein in cirrhotic rats. NE significantly reduced maximum contraction of BDL mesenteric artery in compared to sham-operated animals (see Fig. 7). The vascular responsiveness to AVP was

also decreased in mesenteric arteries but did not reach statistical significance as compared with the control group. The maximum contraction of vena cava and carotid was unchanged to NE as well as AVP treatment between the two groups. In cirrhotic rats, maximum contraction to NE significantly increased in comparison to AVP group both in portal veins and mesenteric arteries.

As we can see in Table 2, LogEC50 values of both NE and AVP doses was unchanged between two groups in all vessels tested in our study. However, LogEC50 values of NE doses significantly increased in comparison to AVP in portal veins, mesenteric arteries and carotids of cirrhotic rats.

Fig. 8 showed the concentration-response curves with calcium and revealed no significant differences between groups.

Discussion

Clinical studies focused on vasoconstrictors roles in treatment of cirrhosis complications have demonstrated the safety and the efficacy of norepinephrine in comparison with terlipressin. TP and NE showed a marked improvement in circulatory and renal function in patients with HRS (Duvoux et al., 2002 ; Alessandria et al., 2007 ; Sharma et al., 2008 ; Singh et al., 2012 ; Gosh et al., 2013). In cirrhotic patients with refractory hypotension, TP and NE treatment drop the systemic vascular resistance and counteract the post-paracentesis refractory hypotension. However, many questions cannot be addressed in human studies, such as the specific effects of these vasoconstrictors on systemic and splanchnic hemodynamic and theirs vascular affinities. To found responses to some of these questions, we developed a sinusoidal intrahepatic portal hypertension model of cirrhosis by bile duct ligation in rats. In our *in vivo* hemodynamic study we have demonstrated that at equivalent hypertensive doses of TP and NE, lowest dose of TP have a cardiodepressant response on cirrhotic and normal rats and prevent from variceal bleeding likely by decreasing significantly SMABF and PVP. In contrast, NE at lowest dose increases myocardial contractility and PVP and have no effect on SMABF in two groups of rats. The effects of vasoconstrictors in cirrhotic animals are specific on portal veins as demonstrated *in vitro* study. The mesenteric arteries of cirrhotic rats are hyporeactive to NE but not AVP.

In our study, BDL model of cirrhosis was considered as the end stage liver disease. Dysfunction of the splanchnic circulation resembles that in patients with late stage liver disease and changes in creatinine clearance by the kidney are similar to those observed in HRS patients.

In this model, the common bile duct ligation and section decreased secretion of bile acids into the intestine and increased proliferation and translocation of intestinal bacteria, leading to

endotoxemia. Bile acids accumulation was confirmed by the significant increase of serum biliribin in BDL rats group after 4 weeks. Inflammation induced by toxic bile acids and endotoxins further enhances liver injury. Increased aminotransferases and alkaline phosphatise demonstrate the cytolysis and fibrosis inducing the disruption of the liver architecture and the increase of the hepatic vascular tone. The increased intra-hepatic resistance induces portal hypertension. Systemic and splanchnic hemodynamic measured before drugs infusion showed the hyperdynamic circulation especially by increased PVP and CBF in BDL rats compared to SHAM groups. The splanchnic vasodilatation induces renal sodium and water retention resulting in renal dysfunction. This later was demonstrated in our model by decreased creatinine clearance, but not significant, in BDL groups after 4 weeks.

In order to evaluate NE and TP on systemic and splanchnic circulation out of MAP variations, we established equivalent hypertensive effects by continuous progressive infusion of the two drugs. TP, a long-acting vasopressin analog, is cleaved *in vivo* by endothelial peptidases to yield vasoactive lysine-vasopressin. As a prodrug, the duration of action of TP is longer than vasopressin, but they have equipotent or comparable effects in portal hypotensive and systemic pressor. It has been demonstrated in human study that lysine-vasopressin begins to appear in the plasma at least 40 min after the application of terlipressin (Forsling et al., 1980). In our rat model the vasoconstrictor effect of TP start to appear at least 20 min after drug infusion. By this way, TP data were recorded after each 20 minutes. Since TP could not be metabolized into lysine-vasopressin in our *in vitro* system, it was imperative to use its active form to perform the vascular reactivity study.

In the present study and another study by Blei et al. (1980), prominent pressor and cardiodepressant effects after TP infusion were observed. This cardiodepressant response of TP has been demonstrated at different doses in many studies of portal hypertension and cirrhotic rats (Lee et al., 2001; Chang et al., 1999; Huang et al., 1997). This result indicates

that the “cardiotoxic side effects” are still an important concern for its use since TP has the advantage of lack of plasminogen activation and less cardiotoxic effects (Walker 1990). However NE infusion was associated with a significant increase in HR. This result indicates the potent and efficacious cardiostimulant effects of NE mediated through the β2-adrenoceptor/Gs/PKA pathway (Heubach et al., 2003).

In vivo studies, NE have been reported to significantly decrease the mesenteric arterial blood flow and portal blood flow but no changing in PVP in experimental portal hypertensive rats by BDL as well as portal vein ligation (PVL) (Coll et al., 2012). TP administrated in bolus or continuous infusion, also reduces the splanchnic hemodynamic circulation by decreasing PVP (Lee et al., 2001; Chang et al., 1999; Bernadich et al., 1997; Huang et al., 1997) and superior mesenteric artery blood flow (Bernadich et al., 1997). *In vitro*, most experimental studies have reported diminution of mesenteric and splanchnic vascular bed responses, both to NE (Bomzon et al., 1991; Huang et al., 1996; Liao et al., 1994; Kiel et al., 1985; Pizcueta et al., 1990; Villamediana et al., 1988; Joh et al., 1991; Comming et al., 1986) and to AVP (Mech et al., 1991; Murry et al., 1986; Heinemann et al., 1997).

Herein, we showed the same portal hypotensive effect of TP in BDL and SHAM groups. In comparison with baseline values, TP significantly decrease PVP with all doses; however NE showed a significant increase in PVP with the lowest doses. This increase in PVP was attenuated with the elevation in NE doses. This portal hypotensive effect is specific on portal vein, as NE and AVP increased maximum contraction in isolated portal veins, but no change in maximum contraction to NE and AVP in vena cava and aorta, from portal hypertensive animals. The increased contractile responsiveness of the portal vein found in this study could be due to an increase in the number or affinity of α_1-adrenoceptors and V_{1a} vasopressin receptors, or a post-receptor change in responsiveness. However, in our study, this amelioration in portal vein vascular reactivity does not seem to be due to the increase in

receptor affinity, since we demonstrated that EC_{50} of NE and AVP were unchanged in BDL rats in comparison with SHAM-operated rats in all vessels. These results are in contrast with other studies in situ or in vivo, who related the change in vascular reactivity to NE, to an increase in the EC_{50} values in mesenteric arteries of portal hypertensive rats (Kiel et al., 1985; Joh et al., 1991). In addition, Liao et al., (1994) have demonstrated that neither K_d nor B_{max} of NE was changed in PVL rats indicating no changes in receptor number or affinity, therefore, it is more likely that the change in contractile responsiveness occurs beyond the post-receptor level (Murray & Paller, 1986).

In BDL groups, the maximum contraction of portal veins and mesenteric arteries to NE were significantly higher than showed by AVP. However, AVP was more potent than NE since the EC_{50} values of NE was higher than AVP EC_{50} values in portal veins and mesenteric arteries of hypertensive rats. These results indicate that the vasopressin receptor affinity to AVP was significantly higher than the adrenergic receptor affinity to NE in cirrhotic portal veins. In addition, the highest affinity of splanchnic and mesenteric beds effect to AVP indicates that somehow this drug is capable of overcoming the largely known low vascular reactivity to vasoconstrictors of BDL and cirrhotic animals. In the other hand, NE was more efficient than AVP in portal veins and mesenteric arteries of hypertensive animals. The efficient portal vasoconstriction effect of NE showed in our study was demonstrated in isolated liver of BDL rats by Fiorucci et al, (Fiorucci et al., 2003). The increased efficacy to the vasoconstricting effect of NE in portal vein of cirrhotic animals indicates that the cirrhotic liver maintains a remarkable ability to adjust the vascular tone in response to regulatory agents. However, in context of cirrhosis, vasoconstrictor effect of NE could aggravate the portal hypertension by increasing hepatic resistances.

In mesenteric vascular bed, TP significantly decrease the SMABF with all doses tested, however the lowest hypertensive dose of NE have no effect on it. NE at highest doses

significantly decreases the SMABF in BDL rats. Coll and colleagues reported in PVL and cirrhotic rats a genetic down-regulation of genes related to the adrenergic system and a sympathetic nerve atrophy/regression in the mesenteric arterial vasculature associated to the splanchnic vasodilation of portal hypertension (Coll et al., 2008 and Coll et al., 2010). These findings are in parallel with our in vitro observation that the mesenteric vascular bed was hyporeactive to NE but not AVP in portal hypertensive states. NE at highest doses might be in part correcting this acquired adrenergic mesenteric down-regulation. This observation is in accordance with other study of a splanchnic vasonstriction induced by an oral form of NE in PVL and cirrhotic rats (Coll et al., 2012). The majority of studies reported a decreased responsiveness in the mesenteric arterial bed observed in different portal hypertensive states to NE (Kiel et al., 1985; Pizcueta et al., 1990; Villamediana et al., 1988; Joh et al., 1991; Bomzon et al., 1987; Liao et al., 1994; Heinemann et al., 1997; Sieber & Groszmann, 1992a,b) and AVP (Mech et al., 1991; Murry et al., 1986; Heinemann et al., 1997) which suggests that hyporeactivity to vasoconstrictors in portal hypertension is a function of the mesenteric arterioles (Cawley et al., 1995; Cahill et al., 1996). This observation is not seems to be adopted by our study since the hyporesponsiveness of the mesenteric artery is limited to NE but not to AVP. The altered responsiveness to NE in mesenteric arteries of cirrhotic rats is also mainly due to impairment at post-receptor level, since the receptor affinity to NE is unchanged also in mesenteric bed. The coupling of vasopressin or adrenergic receptors to G-proteins leads to phospholipase C production and Ca^{2+} release inducing vascular contraction. Wu & Benoit (1994) have reported reduced contraction by G-protein and protein kinase C activators in mesenteric bed of PVL rats. Their results supported by a clinical study (Laffi et al., 1993) provide evidence that cellular second messenger system was impaired in portal hypertension. Additionally, Gαs protein coupling leads to adenylate cyclase activation and cAMP production that induces vascular relaxation in rat vessels (Gurdal et al., 1995; Baloglu

et al., 2007). Huang et al., (1995) observed an increase in arterial cAMP and cGMP contents in PVL rats, which may expected an increase in vasodilators amount in mesenteric circulation as cAMP is the second messenger mechanism for such vasodilators (Farah, 1983; Vane et al., 1990). It has been suggested that the increased circulating endogenous vasodilators substance could be in part responsible for the mesenteric bed hyporesponsiveness to NE. Some studies have reported that such a vasodilator could be glucagon (Benoit et al., 1984; Pizcueta et al. 1990), prostacyclin (Hamilton et al., 1982; Sitzmann et al. 1989), nitric oxide (Sieber et al. 1992b; Claria et al. 1994; Karatapanis et al. 1994), octopamine (Lam et al., 1973) or natriuretic peptide (Olivera et al., 1987; Fernendez-Cruz et al., 1985; Garcia et al., 1984). *In vivo*, excessive production of endogenous vasodilators in the mesenteric bed, act as physiologic antagonists of the mesenteric vasoconstrictors (Benoit et al., 1984). An adaptive change occurred in this situation may cause the altered contractile responsiveness of the mesenteric arteries to vasoconstrictors. The altered contractile responsiveness is revealed also in our *in vitro* study despite that a physiological antagonism by vasodilators would be absent *ex vivo*. This could be explained as our vessels were exposed to vasodilators *in vivo* and their effects could be observed *in vitro*. However, in the present study, response to the vasoconstrictors NE was increased in portal veins but decreased in mesenteric arteries, although both tissues were presumably exposed to vasodilators *in vivo*. This difference may be due to differing susceptibilities to the actions of vasodilators (Cawley et al., 1995; Connolly et al., 1999).

Ralevic et al., (1996) explained the mesenteric arteries hyporesponsiveness of cirrhotic rats by the impairment of such vascular bed with respect to influx or utilization of extracellular Ca^{2+}. Under same situation, Hartleb et al., (1993) showed a vascular hyporeactivity to endothelin-1 contributed by a limited opening of L-type calcium channels. This hypothesis contrasts with our findings in our cirrhotic rat model. The dose-response curve of Ca^{2+} was unchanged

between BDL and SHAM-operated animals in all vessels. This suggest that the calcium signalling pathways was untouched after cirrhosis, since the extracellular Ca^{2+} induces significant contraction without any differences between the two groups. Considering that Ca^{2+} act to create contraction in smooth muscle cells rather than at the receptor level, it is more likely that the change in contractile responsiveness occurs beyond the interaction between receptor/agonist levels.

In addition, it is important to note that these changes in reactivity in cirrhotic rats were also specific for the portal and mesenteric territories, since the response to these agonists was not changed in the carotid and vena cava from cirrhotic rats. Our results in the aorta are similar to these observed by Bomzon & Blendis, (1987) and Cawley et al., (1995). In other studies of portal hypertension and cirrhotic animals, the contractile response to NE in the aorta was reported to be increased (Cannolly et al., 1999; Bomzon et al., 1991) or decreased (Michielson et al., 1995; Bomzon & Blendis, 1987; Claria et al., 1994).

Conclusion:

The major conclusion to be drawn from the current data is that both noradrenaline and terlipressin correct the portal hypertension by reducing PVP and MVBF with a superiority to TP at low doses. The vasoconstrictor effect of the two drugs in cirrhotic rats is specific on splanchnic vessels with a highly affinity to vasopressin agonist compared to noradrenaline. In addition, mesenteric arteries of cirrhotic rats are hyporeactive to NE but not AVP. These changes in contractile responsiveness are more likely occurred beyond the post-receptor level. However, an increased efficacy to the vasoconstricting effect of NE in mesenteric and splanchnic vessels of cirrhotic animals could aggravate the portal hypertension by increasing hepatic resistances. Taken together, we suggest that the vasopressin analogue is a potent

vasoconstrictor as well as portal hypotensive drug and could reduce the variceal bleeding risk associated with cirrhosis in comparison to NE.

References

1. Alessandria C, Ottobrelli A, Debernardi-Venon W, Todros L, Torrani Cerenzia M, Martini S, Balzola F, Morgando A, Rizzetto M, Marzano A. Noradrenalin vs terlipressin in patients with hepatorenal syndrome: a prospective, randomized, undlinded, pilot study. J Hepatol 2007; 47: 499-505.
2. Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kvietys PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. Am J Physiol 1984; 247: G48693.
3. Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kvietys PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. Am J Physiol 1984; 247: G486-93.
4. Bernadich C, Bandi JC, Melin P, Bosch J. Effect of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in rats model of portal hypertension. Hepatology 1998; 27: 351-356.
5. Blei AT, Groszmann RJ, Gusberg R, Conn HO. Comparison of vasopressin and triglycyl-lysine vasopressin on splanchnic and systemic hemodynamics in dogs. Dig Dis Sci 1980; 25: 688-694.
6. Blendis L, Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol Ther* 2001; **89**: 221-231.
7. Bomzon A, Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal hypertension. Am J Physiol 1987; 252: Gl58-62.
8. Bomzon A, Jacob G, Lee SS, Meddings J. In vitro vascular responsiveness to norepinephrine in experimental portal hypertension. Clin Invest Med 1991; 14: 63-71.
9. Bomzon, A. & Blendis, L.M. The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. Hepatology 1994; 20: 1343-1350.
10. Cahill PA, Hou M-C, Zhang S, Redmond EM, Sitzmann JV. Increased expression of endothelin receptors in hyperemic vessels from portal hypertensive rats. Hepatology 1996; 24: 317A.
11. Cahill PA, Wu Y, Sitzmann JV Altered adenylyl cyclase activities and G-protein abnormalities in portal hypertensive rabbits. J Clin Invest 1994; 93: 2691-700.

12. Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. Hepatology 1993;18:367-72.
13. Cawley T, Geraghty J, Osborne H, Docherty JR. Effects of portal hypertension on responsiveness of rat mesenteric artery and aorta. Br J Pharmacol 1995; 114; 791-796.
14. Chang FC, Huang YT, Lin HC, Hong CY, Lin JG, Chen KJ. Beneficial effects of combined terlipressin and tetramethylpyrazine administration on portal hypertensive rats. Can J Physiol Pharmacol 1999; 77: 618-624.
15. Claria J, Jimenez W, Ros J. et al. Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994; **20**: 1615-1621.
16. Coll M, Genesca J, Raurell I, Rodriguez-Vilarrupla A, Mejias M, Otero T, et al. Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. J Hepatol 2008;49:43-51.
17. Coll M, Martell M, Raurell I, Ezkurdia N, Cuenca S, Hernandez-Losa J, et al. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. Liver International 2010;30:593-602.
18. Coll M, Rodriguez S, Raurell I, Ezkurdia N, Brull A, Augustin S, Guardia J, Esteban R, Martell M, and Genesca J. Droxidopa, an Oral Norepinephrine Precursor, Improves Hemodynamic and Renal Alterations of Portal Hypertensive Rats. Hepatology 2012; 56: 1849-59.
19. Connolly C, Cawley T, P. McCormick PA, Docherty JR. Portal hypertension increases vasoconstrictor responsiveness of rat aorta. Clin Science 1999; 96: 41-47.
20. Cummings SA, Groszmann RJ, Kaumann AJ. Hypersensitivity of mesenteric veins to 5-hydroxytriptamine- and ketanserin- induced reduction of portal pressure in portal hypertensive rats. Br J Pharmacol 1986; 89: 501-513.
21. Duvoux C, Zanditenas D, Hezodec C. Effects of noradrenalin and albumin in patients with type I hepatorenal syndrome: a pilot study. Hepatology 2002; 36: 374-380.
22. Farah AE. Glucagon and the circulation. Pharmacol Rev 1983; 35: 181-217.
23. Fernandez-Cruz A, Marco J, Cuadrado LM, Gutkowska J, Caramelo C, Lopez-Novoa JM. Plasma levels of atrial natriuretic factor in cirrhotic patients. Lancet 1985; ii: 1439-1440.
24. Finberg JPM, Syrop HA, Better OS. Blunted pressor response to angiotensin and sympathomimetic amines in bile duct-ligated dogs. Clin Sci Mol Med 1981;61:535-9.

25. Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. J Hepatol. 2003; 39: 932-9.
26. Forsling ML, Aziz LA, Davies R, Donovan B, Miller M. Conversion of triglycylvasopressin to lysine-vasopressin in man. J Endocrinol 1980; 85: 237-44.
27. Garcia R, Thibault G, Cantin N, Genest G. Effect of a purified arterial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds. Am J Physiol 1984; 247: R34-R39.
28. Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; **19**: 250-258.
29. Ghosh S, Choudhary N, Sharma K, Singh B, Kumar P, Agarwal R, Sharma N, Bhalla A, Chawla Y, Singh V. Noradrenaline vs. terlipressin in the treatment of type 2 hepatorenal syndrome: a randomized pilot study. Liver Intern 2013; 33: 1187-93.
30. Gimson AES, Westaby D, Hegarty J, Watson A, Williams R. A randomized trial of vasopressin and vasopressin plus nitroglycerin in the treatment of acute variceal hemorrhage. Hepatology 1986; 6: 410-3.
31. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. Hepatology 1998; 28: 926-931.
32. Hamilton G, Phing CF, Hutton RA, Dandona P, Hobbs EF. The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. Hepatology (Baltimore) 1982; 2: 236-242.
33. Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin-1 in rats with cirrhosis. Gastroenterology 1994;107:1085-93.
34. Hasper D, Jörres A. New insights into the management of hepato-renal syndrome. Liver Int 2011; 31 Suppl 3: 27-30.
35. Heinemann A, Wachter CH, Holzer P, Fickert P, Stauber RE. Nitric oxide-dependent and -independent vascular hyporeactivity in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. Br J Pharmacol 1997; 121: 1031-1037.
36. Heller J, Schepke M, Gehnen N, Molderings GJ, Müller A, Erhard J, Spengler U, Sauerbruch T. Altered adrenergic responsiveness of endothelium-denuded hepatic

arteries and portal veins in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1999; **116**: 387-393.

37. Heubach JF, Blaschke M, Harding SE, Ravens U, Kaumann AJ. Cardiostimulant and cardiodepressant effects through overexpressed human beta2-adrenoceptors in murine heart: regional differences and functional role of beta1-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367: 380-90.
38. Huang YT, Lin HC, Yu PC, Lee FY, Tsai YT, Lee SD and Yang MCM. Decreased vascular reactivity of portal Hypertension vein in rats with portal. *J Hepatology* 1996; **24**: 194-199.
39. Huang YT, Lo Jw, Lin HC, Tsai YT, Hong CY, Yang MCM. Change in vascular CAMP and cGMP contents in portal hypertensive rats. Pharmacology 1995; 50: 86-91.
40. Huang YT, Tsai JF, Lin HC, Chen CF, and Hong CY. Hemodynamic effects of acute tetrandrine and terlipressin administration on portal hypertensive rats. Can J Physiol Pharmacol 1997 ; **75**: 1220-1225.
41. Joh T, Granger DN, Benoit JN. Intestinal microvascular responsiveness to norepinephrine in chronic portal hypertension. Am J Physiol 1991; 260: Hll3543.
42. Karatapanas S, McCormick PA, Kakad S. et al. Alteration in vascular reactivity in isolated aortic rings from portal vein-constricted rats. Hepatology 1994; **20**: 1516-1521.
43. Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shephard AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portalhypertensive rats. Am J Physiol 1985; 248: Gl92-5.
44. Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats. Am J Physiol 1985;248:G192-5.
45. Laffi G, Marra F, Failli P Ruffiero M, Cecchi E, Carloni V, Giotti A, Gentilini l? Defective signal transduction in platelets from cirrhotics is associated with increased cyclic nucleotides. Gastroenterology 1993; 105: 148-56.
46. Lam KC, Tall AR, Goldstein GB. Role of false neurotransmitter, octopamine, on the pathogenesis of hepatic and renal encephalopathy. Scand J Gastroenterol 1973; 8: 464-472.

47. Lebrec D, Moreau R, Cailmail S, Sogni P, Oberti F, Hadengue A. Effects of terlipressin on hemodynamics and oxygen content in conscious portal vein-stenosed and cirrhotic rats receiving propranolol. J Hepatol 1993; 17: 102-7.
48. Lebrec D. Parmacological treatment of portal hypertension: hemodynamic effects and prevention of bleeding. Pharmacol Ther 1994; 61: 65-107.
49. Lee FY, Chu CJ, Wang SS, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Wu SL, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Inhibition of prostacyclin by indomethacin ameliorates the splanchnic hypoensitivity to glypressin in haemorrhage-transfused common bile duct-ligated rats. 2001; 31: 145-153.
50. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. Am J Physiol 1986;251:G176-G180.
51. Liao JE Yu PC, Lin HC, Lee FY, Kuo JS, Yang MCM. Study on the vascular reactivity and α_1-adrenoceptor of portal hypertensive rats. Br J Pharmacol 1994; 111: 43944.
52. Merkel C, Gatta A, Bolognesi M, Finucci G, Battaglia G, Angeli P, Zuin R. Hemodynamic changes of systemic, hepatic and splenic circulation following triglycyl-lysin-vasopressin administration in alcoholic cirrhosis. Dig Dis Sci 1988; 33: 1103-9.
53. Mesh CL, Joh T, Korthuis RJ, Granger DN, Benoit JN. Intestinal vescular sensitivity to vasopressin in portal hypertensive rats. Gastroenterology 1991; 100: 916-921.
54. Michielsen PP, Boeckxstaens GE, Su S, Herman AG and Pelckmans PA. The role of increased nitric oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal vein ligated rats. J Hepatol 1995; **23**: 341-347.
55. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res 1977; 41: 19-26.
56. Murray BM, Paller MS. Pressor resistance to vasopressin in sodium depletion, potassium depletion and cirrhosis. Am J Physiol 1986; 251: R525-30.
57. Narahara Y, Kanazawa H, Taki Y, Kimura Y, Atsukawa M, Katakura T, Kidokoro H, Harimoto H, Fukuda T, Matsushita Y, Nakatsuka K, Sakamoto C. Effects of terlipressin on systemic, hepatic and renal hemodynamics in patients with cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol 2009; 24: 1791-1797.
58. Olivera A, Gutkowska J, Rodriguez-Puyol D, Fernandez-Cruz A, Lopez-Novoa JM. Plasma levels of atrial natriuretic peptide in rats with experimental cirrhosis of the

liver before and acute volume expansion. In Diuretics Edited by J B Puschett. Elsevier Science, New York 1987; pp. 267-269.

59. Orrego H, Medline A, Blendis LM, Rankin JG, Kreaden DA. Collagenisation of the Disse space in alcoholic liver disease. Gut 1979; 20: 673-9.
60. Pizcueta MP, Casamitjana R, Bosch R, Rodes J. Decreased systemic vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats: role of hyperglucagonism. Am J Physiol 1990; 258: G191-5.
61. Ralevic V, Mathie RT, Moore KP, Burnstock G. Vasoconstrictor responsiveness of the rat mesenteric arterial bed in cirrhosis. Br J Pharmacol 1996; 118: 435-441.
62. Rodriguez-Vilarrupla A, Fernandez M, Bosch J, Gracia-Pagan JC. Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension. Ann Hepatol. 2007;6:28-36.
63. Ryan J, Krishnankutty S, Jennings G, Elser M, Dudley F. Impaired reactivity of the peripheral vasculature to pressor agents in alcoholic cirrhosis. Gastroenterology 1993;105:1167-72.
64. Sharma P, Kumar A, Sharma BC, Sarin SK. An open label, pilot, randomized controlled trial of noradrenaline versus terlipressin in the treatment of type 1 hepatorenal syndrome and predictors of response. Am J Gastroenterol 2008; 103: 1689-97.
65. Sieber CC, Groszmann RJ. In vitro hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. Am J Physiol 1992;262:G996-1001 (a).
66. Sieber, C.C. & Groszmann, R.J. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. Gastroenterology 1992; 103: 235-239 (b).
67. Singh V, Ghosh S, Singh B, Kumar P, Sharma N, Bhalla A, Sharma AK, Choudhary NS, Chawla Y, Nain CK. Noradrenalin vs. terlipressin in the treatment of hepatorenal syndrome: A randomized study. J Hepatol 2012; 56: 1293-98.
68. Sitzmann JV, Bulkley GB, Mitchell MC, Campbell K. Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. Ann Surg 1989; 209: 322-7.
69. Tsai MH. Splanchnic and systemic vasodilatation: the patient. J Clin Gastroenterol. 2007;41 Suppl 3:S266-S271.

70. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med 1990; 323: 27-37.
71. Villamediana LM, Dieguez G, Santos JC, Garcia-Villalon AL, Caramelo C, Lopez-Novoa JM. Vascular reactivity to norepinephrine in rats with cirrhosis of the liver. Can J Physiol 1988; 66: 567-572.
72. Walker S, Stiehl A, Raedsch R, Kommerell B. Terlipressin in bleeding esophageal varices: a placebo-controlled double-blind study. Hepatology 1986; 6: 112-5.
73. Walker S. Vasoconstrictor therapy in bleeding esophageal varices. Hepato-gastroenterology 1990; 37: 538-543.
74. Wu Z-Y, Benoit JN. Nonreceptor-mediated intestinal vasoconstriction in portal hypertensive rats. Am J Physiol 1994; 267: H370-5.

Tables:

Table 1

	SHAM (n=10)	BDL (n=10)
Phosphatase Alkaline (UI/L)		
Week 0	354.6±47.7	324.5±47.7
Week 4	127±26.0	449.8±50.8
ASAT (UI/L)		
Week 0	147.6±80.8	162.5±50.9
Week 4	120.7±39.3	791±144
ALAT (UI/L)		
Week 0	54.2±26.3	46.5±10.1
Week 4	31.3±7.6	177.2±51
Bilirubin (µmol/L)		
Week 0	1±0	2±0
Week 4	1±0	165.7±61.1
CrCl (mL/min)		
Week 0	1.4±0.3	1.2±0.3
Week 4	3.2±0.9	2.6±1.1
Urée/Kg		
Week 0	5.6±1.4	4.2±1.9
Week 4	8.5±2.1	13.1±6.7

CrCl, Creatinine clearance. Blood and urine biochemical analysis of BDL and sham-operated rats before and 4 weeks after surgical procedure.

*P <0.05, significantly different from sham-operated rats.

Table 2

$LogEC_{50}$	Portal vein		Mesenteric artery		Carotid		Vena cava	
	AVP	NE	AVP	NE	AVP	NE	AVP	NE
SHAM (n=5)	-8.4±0.9	-5.7±0.2	-7.5 ± 0.3	-5.6 ± 0.1	-6.3 ± 4.3	-6.1 ± 0.2	-8.7 ± 1.3	-5.8 ± 0.3
BDL (n=15)	-7.9±0.4*	-5.9±0.2	-7.3 ± 0.3*	-5.7 ± 0.1	-7.7 ± 0.3*	-6,01 ± 0.3	-8.8 ± 2*	-5.8 ± 0.1

$LogEC_{50}$ responses of norepinephrine (NE) and vasopressin (AVP) in portal vein, mesenteric artery, carotid and vena cava of BDL and sham-operated rats.

*P <0.05, significantly different from NE-BDL rats.

Figure legends:

Figure 1: Mean arterial pressure (MAP). In Sham-TP group (white square), Sham-NE group (black square), BDL-TP group (white circle) and BDL-NE group (black circle). Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for Sham-TP group, n = 5 rats for Sham-NE group, n = 10 rats for BDL-TP group and n = 10 rats for BDL-NE group.

Figure 2: Carotid blood flow (CBF). In Sham-TP group (white square), Sham-NE group (black square), BDL-TP group (white circle) and BDL-NE group (black circle). Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for Sham-TP group, n = 5 rats for Sham-NE group, n = 10 rats for BDL-TP group and n = 10 rats for BDL-NE group.

Figure 3: Heart rate (HR). In Sham-TP group (white square), Sham-NE group (black square), BDL-TP group (white circle) and BDL-NE group (black circle). Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for Sham-TP group, n = 5 rats for Sham-NE group, n = 10 rats for BDL-TP group and n = 10 rats for BDL-NE group.

Figure 4: Superior mesenteric arterial blood flow (SMABF). In Sham-TP group (white square), Sham-NE group (black square), BDL-TP group (white circle) and BDL-NE group (black circle). Data are expressed as mean ± SD of n = 5 rats for Sham-TP group, n = 5 rats for Sham-NE group, n = 10 rats for BDL-TP group and n = 10 rats for BDL-NE group. *P <0.05, significantly difference between BDL-TP and BDL-NE groups.

Figure 5: Portal vein pressure (PVP). In Sham-TP group (white square), Sham-NE group (black square), BDL-TP group (white circle) and BDL-NE group (black circle). Data are

expressed as mean ± SD of n = 5 rats for Sham-TP group, n = 5 rats for Sham-NE group, n = 10 rats for BDL-TP group and n = 10 rats for BDL-NE group. *P <0.05, significantly difference between BDL-TP and BDL-NE groups.

Figure 6: Concentration-response curves *in vitro*: (a) concentration-response curve of NE on portal vein, (b) concentration-response curve of AVP on portal vein, (c) concentration-response curve of NE on vena cava, (d) concentration-response curve of AVP on vena cava, (e) concentration-response curve of NE on mesenteric artery, (f) concentration-response curve of AVP on mesenteric artery, (g) concentration-response curve of NE on carotid and (h) concentration-response curve of AVP on carotid. Sham-AVP group (white square), Sham-NE group (white circle), BDL-AVP group (black square) and BDL-NE group (black circle). Data are expressed as mean ± SD. *P <0.05, significantly different between Sham and BDL groups.

Figure 7: Maximum contraction *in vitro* (Emax): (a) Emax on portal vein, (b) Emax on mesenteric artery, (c) Emax on carotid and (d) Emax on vena cava. Data are expressed as mean ± SD. *P <0.05, significantly different between groups.

Figure 8: Concentration-response curves of calcium *in vitro*: (a) concentration-response curve on portal vein, (b) concentration-response curve on vena cava, (c) concentration-response curve on mesenteric artery and (d) concentration-response curve on carotid. Sham group (black circle) and BDL group (black square). Data are expressed as mean ± SD. *P <0.05, significantly different between Sham and BDL groups.

Figures:

Figure 1

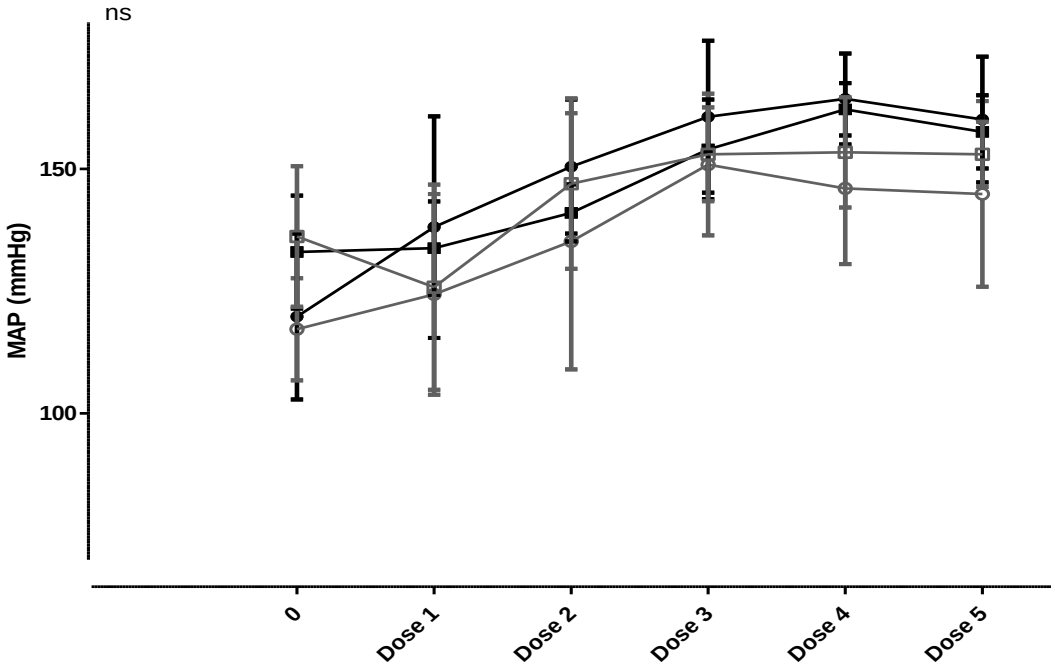


Figure 2

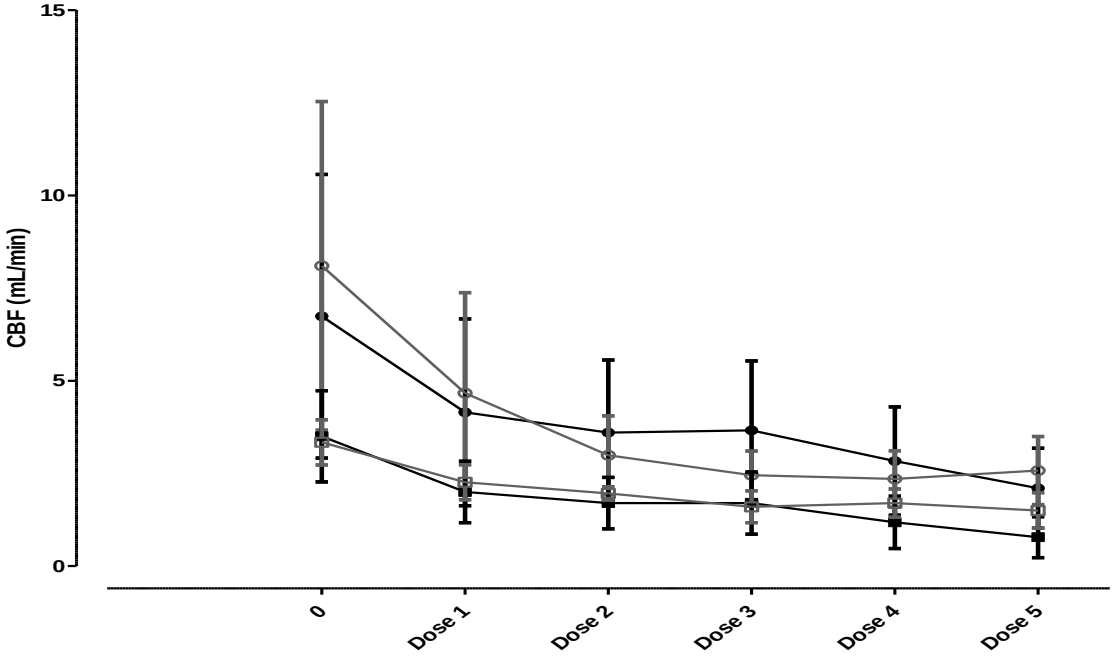


Figure 3

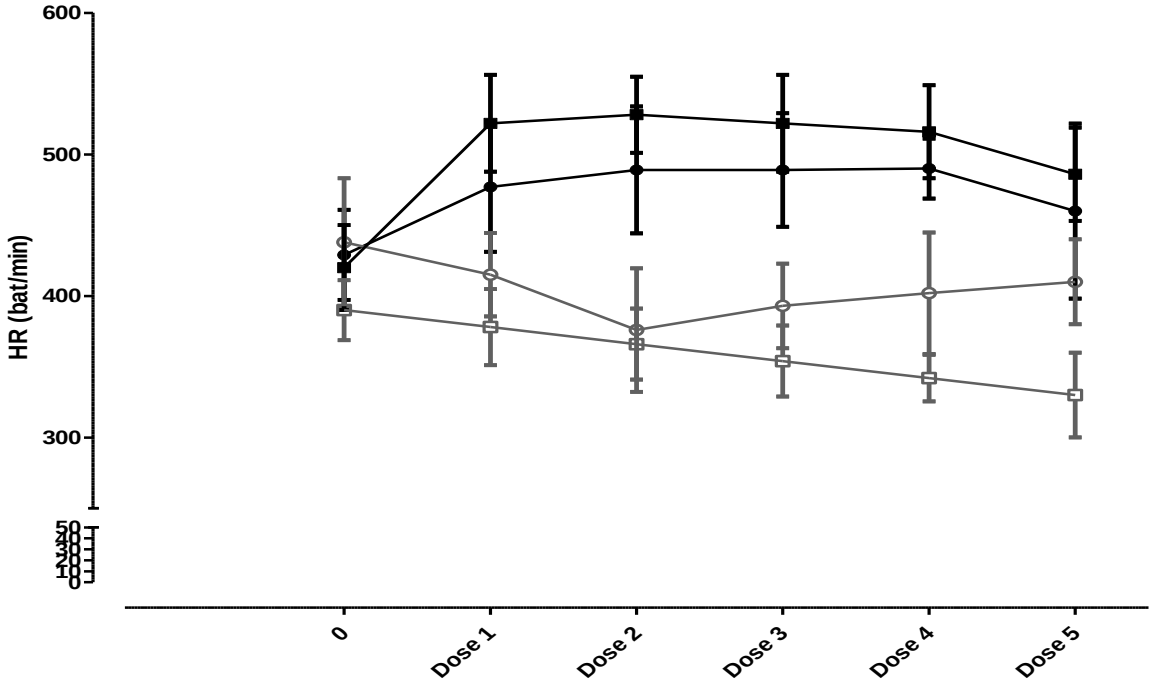


Figure 4

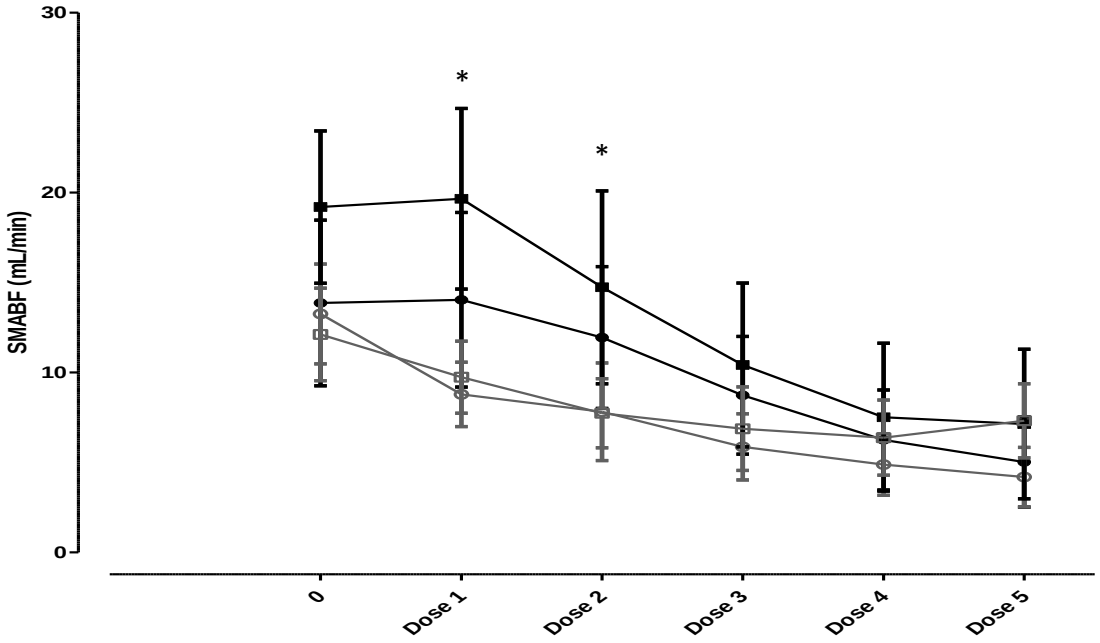


Figure 5

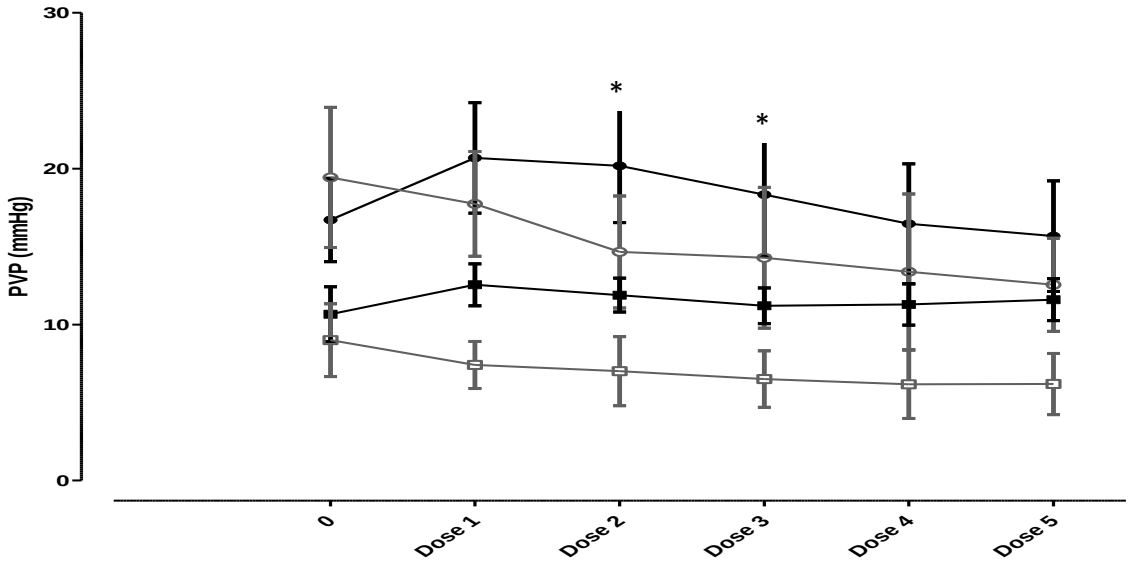


Figure 7

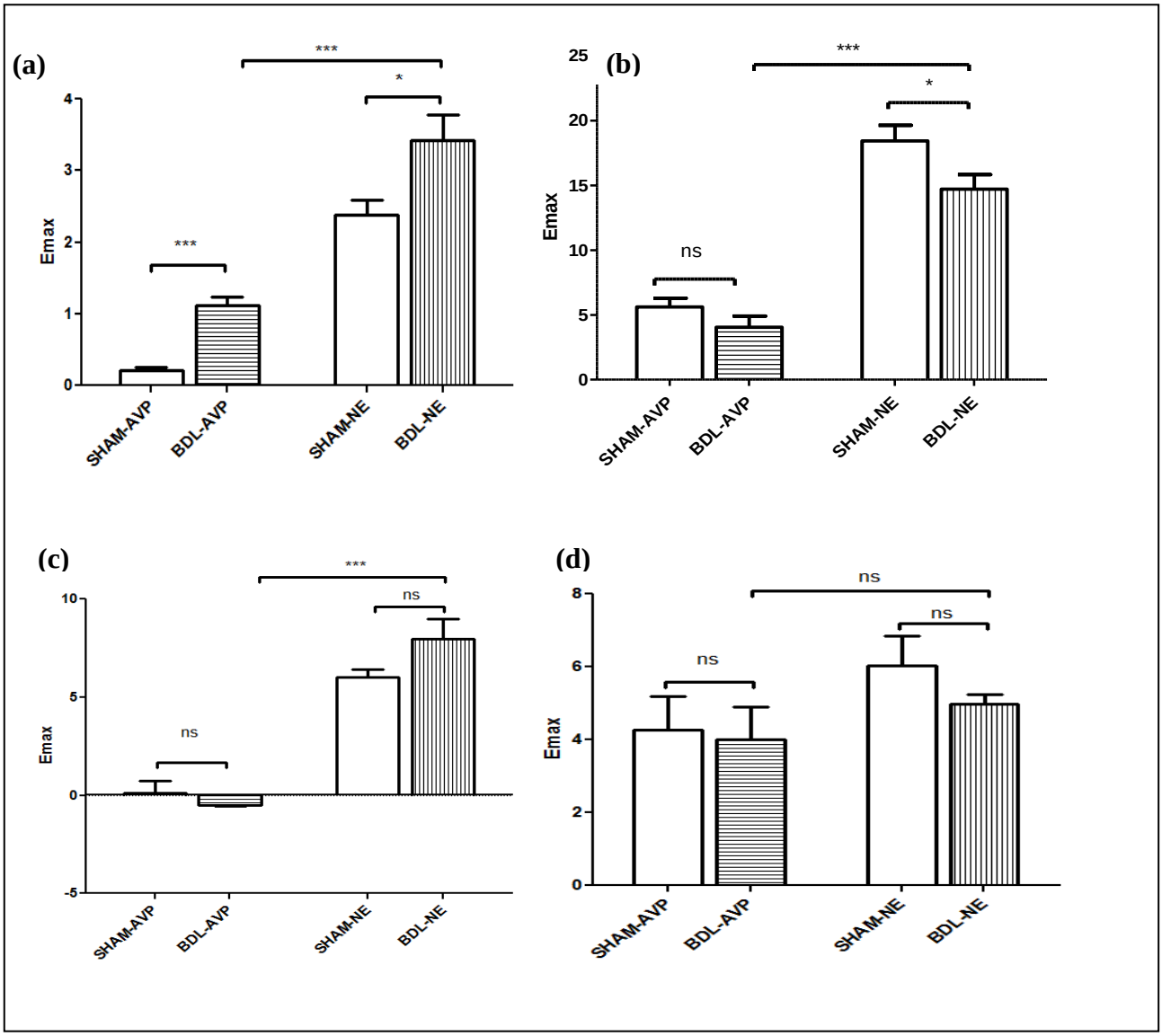


Figure 6

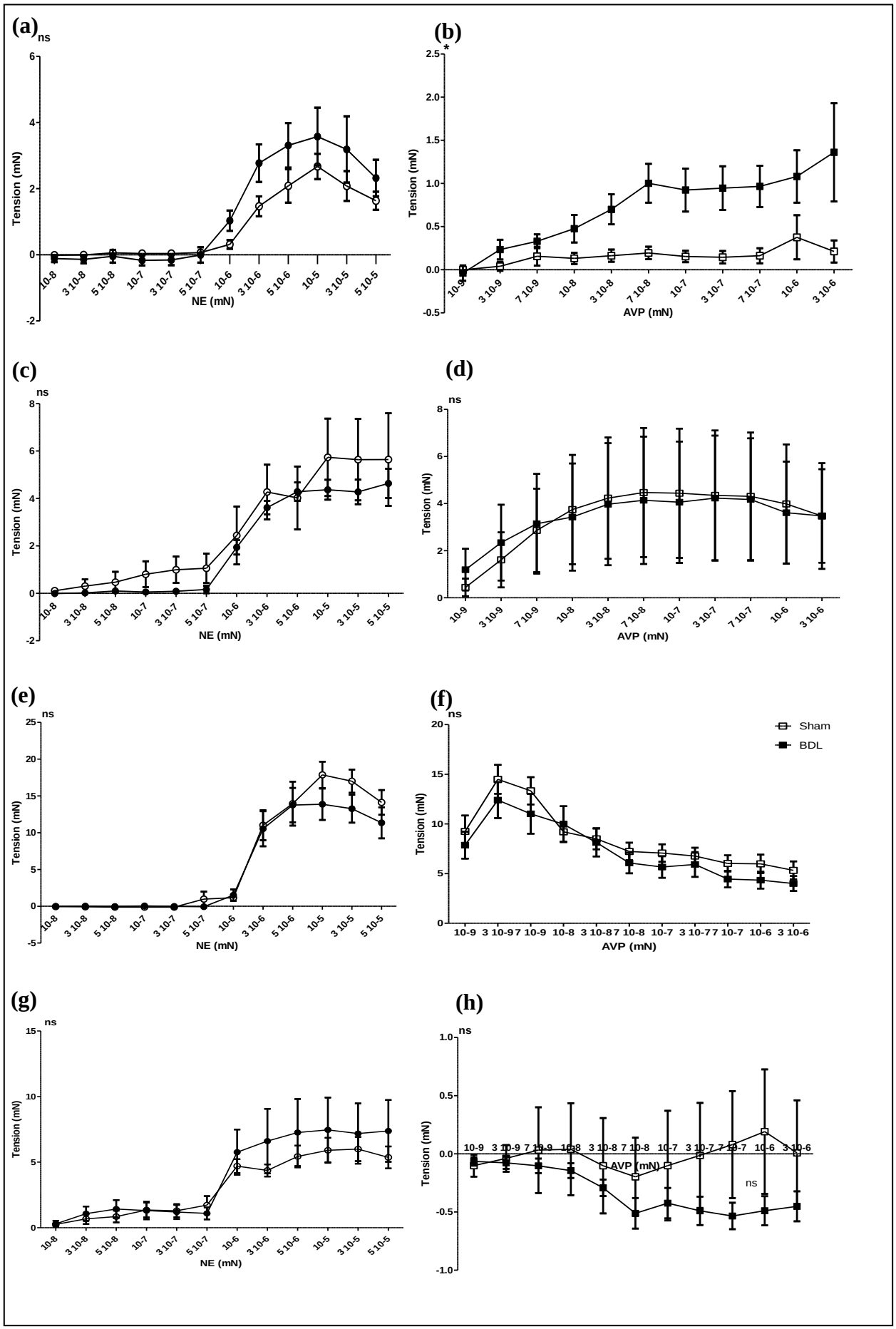
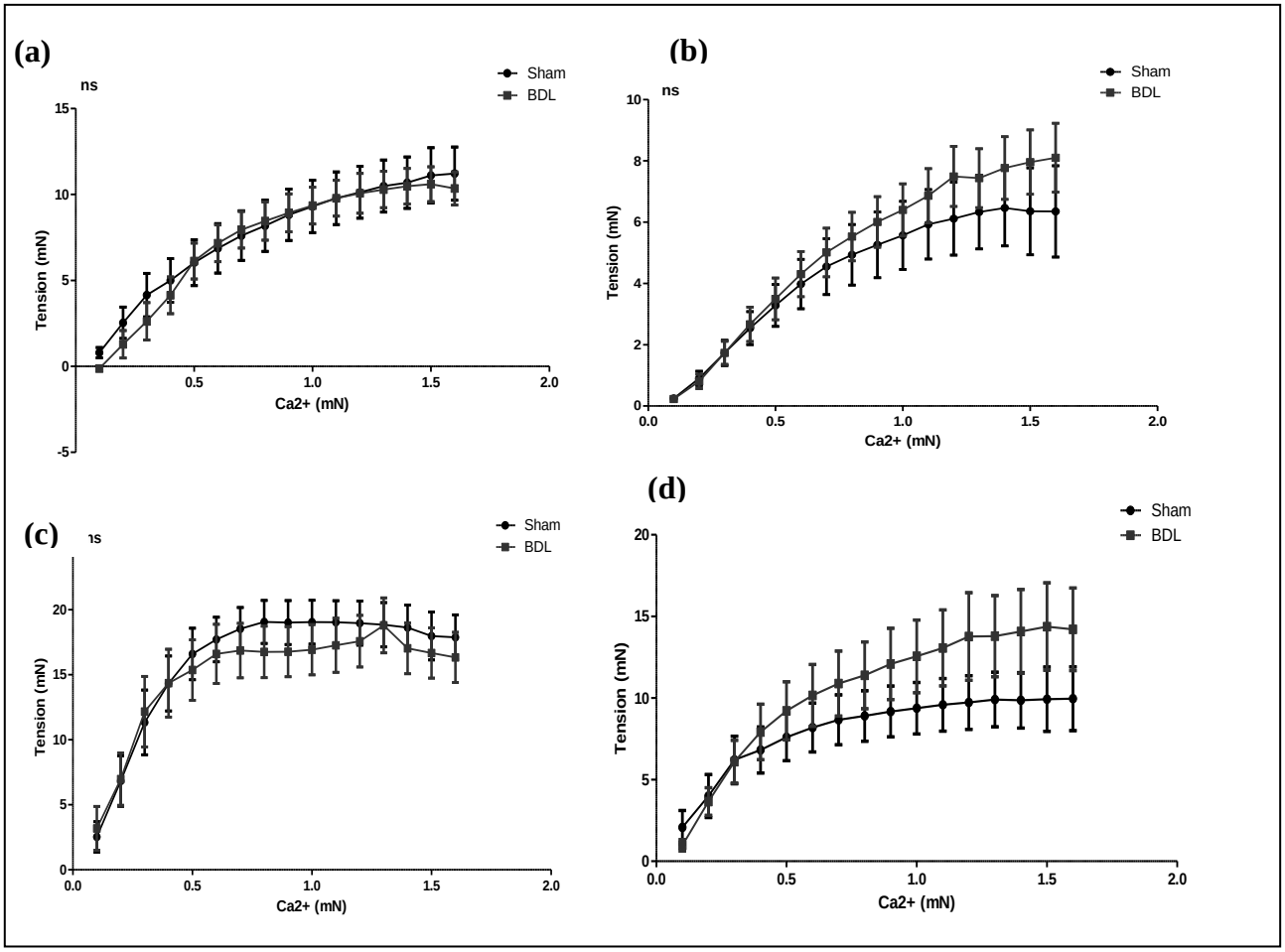

(a)
ns
Tension (mN)
NE (mN)
(b)
*
Tension (mN)
AVP (mN)
(c)
ns
Tension (mN)
NE (mN)
(d)
ns
Tension (mN)
AVP (mN)
(e)
ns
Tension (mN)
NE (mN)
(f)
ns
Sham
BDL
Tension (mN)
AVP (mN)
(g)
ns
Tension (mN)
NE (mN)
(h)
ns
Tension (mN)
AVP (mN)
ns

Figure 8


(a)
ns
Sham
BDL
Tension (mN)
Ca2+ (mN)
(b)
ns
Sham
BDL
Tension (mN)
Ca2+ (mN)
(c)
ns
Sham
BDL
Tension (mN)
Ca2+ (mN)
(d)
Sham
BDL
Tension (mN)
Ca2+ (mN)

6. CONCLUSIONS

D'après notre étude, on prouve que les deux vasoconstricteurs, la terlipressine et la noradrenaline, présentent des effets systémiques comparables sauf au niveau de la fréquence cardiaque ; la terlipressine a un effet cardio-dépressif alors que la noradrénaline stimule le rythme cardiaque. Au niveau splanchnique, la terlipressine ainsi que la noradrénaline à fortes doses corrigent l'hypertension portale induite par la cirrhose en diminuant la pression porte (PVP) et le débit de l'artère mésentérique supérieur (SMABF). Les effets de la TP à faible dose dominent ceux de la NE qui augmente la PVP sans diminuer le SMABF. Notre étude, *in vitro*, montre que les deux molécules testées ont des effets spécifiques ciblés sur le territoire splanchnique avec une affinité plus importante pour l'agoniste de la vasopressine par rapport à la noradrénaline. Par conséquence, la réactivité vasculaire de l'artère mésentérique des rats cirrhotiques est significativement diminuée en face de la NE. Ces changements dans les réponses vasculaires sont probablement survenus au niveau post-récepteur.

L'augmentation de l'efficacité de la NE dans la veine porte des rats cirrhotiques avec son effet hypertenseur sur la pression porte *in vivo*, montrent que cette molécule pourrait aggraver l'hypertension portale par augmentation des résistances hépatiques et ainsi favoriser le risque hémorragique. Ainsi, le profil de réponse hémodynamique de la TP est plus favorable que celui de la NE pour réduire le risque d'hémorragie digestive lié à la cirrhose.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était l'étude des conséquences hémodynamiques *in vivo* et *ex vivo* des trois cas de dysfonction vasculaire ; choc septique, choc hémorragique et cirrhose aux niveaux systémique, splanchnique et de l'organe, ainsi que les effets des molécules vasoactives (H_2S, TP et NE) dans ces situations pathologiques sur l'hémodynamique, les réponses inflammatoires, la fonction rénale et la réactivité vasculaire dans des modèles expérimentaux de choc induisant une ischémie/reperfusion et de la cirrhose induisant une hypertension portale.

Lorsque le rein est agressé, après un choc hémorragique ou en cas de sepsis notamment, une modification de la réponse rénale aux stimuli vasoconstricteurs et vasodilatateurs a été observée. Une altération de l'autorégulation rénale est fréquemment citée dans ces conditions, avec une perte du maintien du débit sanguin rénal lors des variations de pression artérielle. Cette première étude est réalisée sur un modèle animal qui traduit l'infection observé chez l'homme afin de mieux comprendre leurs rôles dans l'altération de l'autorégulation rénale. Notre étude entre donc dans le cadre d'un projet stratégique transversal (expérimental et clinique) qui vise à évaluer les perturbations hémodynamiques rénales aux niveaux macro- et microcirculatoire. Notre modèle montre que lors de la phase précoce, le sepsis n'a pas d'impact particulier sur le rein alors que le débit artériel rénal varie en réponse aux variations de pression artérielle moyenne, incluant le phénomène « d'autorégulation ». L'effet vasoconstricteur de la noradrénaline ne semble pas avoir d'impact sur la fonction rénale, du moins sur le court terme. Néanmoins, d'un point de vue microcirculatoire, le sepsis est associé très rapidement à une augmentation du flux sanguin dans les capillaires corticaux péritubulaires et à une dysfonction rénale limitée par la perfusion de noradrénaline.

La deuxième étude expérimentale *in vivo* des mécanismes d'ischémie/reperfusion vise à évaluer l'effet de H_2S sur la fonction rénale et sur l'hémodynamique rénale en reprenant le modèle de choc hémorragique mis au point au laboratoire avec un remplissage vasculaire continu permettant de maintenir la pression artérielle moyenne et le débit rénale constants. Nos résultats montrent que l'hydrogène sulfuré exogène administré juste avant la retransfusion pourrait exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la CSE dans le rein ce qui explique

l'effet neutre de NaHS sur les vitesses microcirculatoires péritubulaires rénales et sur la fonction rénale dans notre modèle expérimental. Par contre, l'H_2S endogène est essentielle pour la fonction rénale et son inhibition par le PAG aggrave la dysfonction rénale après une diminution des vitesses microcirculatoires péritubulaires corticales et favorise un syndrome de fuite capillaire majoré suite à la stimulation de la perméabilité endothéliale par diminution du VEGF et de l'angiopoietine -1 (Ang-1). Les effets bénéfiques de H_2S endogène passe probablement par l'activité enzymatique de CSE dans le rein.

Notre troisième modèle expérimental de défaillance vasculaire était représenté par la cirrhose effectuée chez les rats par ligature et coupure du canal cholédoque. Nous avons montré que la NE pourrait aggraver l'hypertension portale et favoriser le risque hémorragique *in vivo* par l'augmentation de la pression porte et *in vitro* par l'augmentation de son efficacité sur la veine porte après la cirrhose. Ainsi, le profil de réponse hémodynamique de la TP est plus favorable que celui de la NE pour réduire le risque d'hémorragie digestive lié à la cirrhose. Les artères mésentériques des rats cirrhotiques étaient hyporéactives face à la NE et ce changement dans la réponse vasculaire est probablement survenu au niveau post-récepteur.

Afin de compléter l'ensemble de nos résultats et de mieux comprendre les effets sur la réactivité vasculaire, des études complémentaires devraient être réalisées sur les vaisseaux des rats cirrhotiques comme le western blot pour déterminer les médiateurs impliqués (NO, Protéine G,…) dans le cas d'un rétrocontrôle négatif ou positif par les vasoconstricteurs.

D'après nos études sur les mécanismes d'ischémie/reperfusion, c'est au cours de la phase de reperfusion que les altérations dues aux chocs septique et hémorragique sont les plus marquées.

Plusieurs travaux ont montré un effet protecteur du préconditionnement ischémique contre les complications de l'ischémie en protégeant l'intégrité membranaire lors de la reperfusion. Un tel mécanisme de protection à été mis en évidence pour la première fois en 1986 par Murry et al, sur un modèle d'ischémie myocardique sur les chiens (Murry *et al.*, 1986). Notre collaboration avec le laboratoire de cardioprotection, remodelage et thrombose (CRT) UPRES EA 3860 nous permettra d'étudier les effets d'un préconditionnement ischémique dans le modèle de choc septique chez le rat par des périodes de clampage/déclampage au niveau du bloc artère veine fémorales.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham E and Freitas AA. Hemorrhage produces abnormalities in lymphocyte function and lymphokine generation. *J Immunol* 1989; 142(3): 899-906.

Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1137-1145.

Abraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq O, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G980–G987.

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci*.2007;27:1129-1138.

Alessandria C, Ottobrelli A, Debernardi-Venon W, Todros L, Torrani Cerenzia M, Martini S, Balzola F, Morgando A, Rizzetto M, Marzano A. Noradrenalin vs terlipressin in patients with hepatorenal syndrome: a prospective, randomized, undlinded, pilot study. *J Hepatol* 2007; 47: 499-505.

Alexander W.R, Schlant R.C, Fuster V, O'Rourke R.A, Roberts R, and Sonnenblick E. Hurst's the heart, arteries and veins. 9th edition ed. 1998 ; McGraw-Hill Health Professional Division. New York.

Ali MY, Mok Y-YP, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK, Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmaco*, 2006; 149 : 625-34.

Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ, High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*, 2000; 192 (4) : 565-70.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR, Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001; 29 (7) : 1303-10.

Asaka S, Shibayama Y, Nakata K, Pathogenesis of focal and random hepatocellular necrosis in endotoxemia: microscopic observation in vivo. *Liver*, 1996; 16 : 183-7.

Baer PG, Giff JC, Hormonal systems and renal hemodynamics. *Ann Rev Physiol*, 1980;42:589–601.

Balian A. La cirrhose et ces complications.ISBN 2005 ; 2-7040-1182-6 ISSN 1269-7591.

Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH, Atypical neural messengers. *Trends Neurosci*, 2001; 24 : 99-106.

Barroso-Aranda J, Schmid-Schönbein G.W, Zweifach B.W, Engler R.L. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res*. 1988;63:437-47.

Baskar R, Li L, Moore PK, Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J*, 2007 : 21: 247-55.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209—18.

Benvegnu L ; Gois M ; Bocsato S ; et al. Histoire naturelle de cirrhose compensée virale : une étude prospective de l'incidence et la hiérarchie des complications majeurs, 2004; 53 : 744-749

Bernadich C, Bandi JC, Melin P, Bosch J. Effect of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in rats model of portal hypertension. *Hepatology* 1998; 27: 351-356.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr, Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83 : 4533-7. Russel JA, Management of sepsis. *N Eng J Med*, 2006; 355 : 1699-713.

Birkedal-Hansen H, Moore W.G, Bodden M.K, Windsor L.J, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, and Engler J.A. Matrix metalloproteinases:a review.*Crit Rev Oral Biol Med*.1993;4(2),197-250.

Blackstone E, Morrison M, Roth MB, H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 2005; 308 : 518.

Blackstone E, Roth MB, Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock*, 2007; 27(4) : 370-372.

Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol.* 1987;4:8–14.

Boerma EC, Mathura K, Van Der Voort P, Spronk PE, Ince C, Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care*, 2005; 9 (6) : R601-6.

Bomzon A, Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal hypertension. Am J Physiol 1987; 252: Gl58-62.

Bonanno FG, Clinical pathology of the shock syndromes. *J Emerg Trauma Shock*, 2011; 4 (2) : 233-243. [02]

Bonanno FG, Physiopathology of shock. *J Emerg Trauma Shock*, 2011; 4 (2) : 222-232. [01]

Bond FR, Johnson G, Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. *Fed Proc*, 1985; 44: 281-9.

Bonventre J, Role of adhesion molecules in acute ischemic renal insufficiency. *Nephrol*, 1998; 19 : 57-8.

Bonventre JV, Weinberg JM, Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14 : 2199-210.

Bos EM, Leuvenink HGD, Snijder PM, Kloosterhuis NJ, Hillebrands J-L, Leemans JC, Florquin S, van Goor H: Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. J Am Soc Nephrol 2009; 20: 1901–1905.

Bos EM, Wang R, Snijder PM, Boersema M, Damman J, Fu M, Moser J, Hillebrands JL, Ploeg RJ, Yang G, Leuvenink HGD, and van Goor H. Cystathionine g-Lyase Protects against Renal Ischemia/Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. J Am Soc Nephrol 2013; 24: 759–770.

Bosch J, Pizcueta M, Fernandez M, et al. Hepatic, splanchnic, and systemic haemodynamic abnormalities in portal hypertension. In: Shields R ed. Balliere's clinical gastroenterology. Portal hypertension. London: Balliere Tindall, 1992;425-436.

Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. J Trauma.1995;39: 411-417.

Bracht H, Scheuerle A, Gröger M, Hauser B, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Wachter U, Vogt JA, Asfar P, Matejovic M, Möller P, Calzia E, Szabó C, Stahl W, Hoppe K, Stahl B, Lampl L, Georgieff M, Wagner F, Radermacher P, Simon F, Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock. *Crit Care Med*, 2012; 40 (7) : 1-11.

Brandtzaeg P, Osnes L, Ostevo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P, Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med*, 1996; 184 (1) : 51-60.

Brealy D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Singer N. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet.2002;360(9328):219-23.

Brezis M, Heyman SN, Epstein FH, Determinants of intrarenal oxygenation. II. Hemodynamic effects. *Am J Physiol*, 1994; 267 : F1059-F1062.

Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJM, Bedock B, Bleichner G, Acute renal failure in intensive care units. Causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality: a prospective, multicenter study. *Crit Care Med*, 1996; 24 : 192-8.

Burroughs AK. The Hepatic Artery, Portal Venous System and Portal Hypertension: the Hepatic Veins and Liver in Circulatory Failure. In: *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, Twelfth Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2011;Chapter 9:152-209.

Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis?. Intensive *Care Med*.2002;28:1208-17.

Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M, Hemorrhagic shock resuscitation with carbon monoxide saturated blood. *Resuscitation*, 2007; 72 : 306-318.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Buccala R, Glauser MP, Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 2000; 6 : 164-70.

Calandra T, Pathogenesis of septic shoc: implications for prevention and treatment. *J Chemother*, 2001; 1 (1) : 173-80.

Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL, Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H2S): development of H2S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J Med Chem*, 2010; 53 : 6275-86.

Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. Hepatology 1993;18:367-72.

Chai W, Wang Y, Lin JY, Sun XD, Yao LN, Yang YH, Zhao H, Jiang W, Gao CJ, Ding Q, Exogenous hydrogen sulfide protects against traumatic hemorrhagic shock via attenuation of oxidative stress. *J Surg Res*, 2012; 176 (1) : 210-9.

Champigneulle B, Braillon A, Kleber G, Gaudin C, Cailmail S, Lebrec D. Adenosine and hemodynamic alterations in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1991; 260(4Pt 1): G543-7.

Chang FC, Huang YT, Lin HC, Hong CY, Lin JG, Chen KJ. Beneficial effects of combined terlipressin and tetramethylpyrazine administration on portal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 618-624.

Chaudry, I. H., A. Ayala, et al. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol* 1990; 259(4 Pt 2): R663-78.

Chen XL, Xia ZF, Wei D, Han S, Ben DF, Wang GQ. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in Kupffer cell secretion of the proinflammatory cytokines after burn trauma. *Burns*.2003;29:533-539.

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(5): H2316-2323.

Childs EW1, Udobi KF, Wood JG, Hunter FA, Smalley DM, Cheung LY. In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock. *Shock*. 2002;18(5):423-7.

Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W.. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* 1996; 41(12):24772481.

Claria J, Jimenez W, Ros J. et al. Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1994; 20: 1615-1621.

Clavel T, Faley M, Hesbert A, Jargot D, Protois JC, Reynier M, and Schneider O: Sulfure d'hydrogène. INRS. Fiche toxicologique n°32, 1997.

Cohen J, The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002 ; 420 (6917) : 885-91.

Coll M, Genesca J, Raurell I, Rodriguez-Vilarrupla A, Mejias M, Otero T, et al. Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *J Hepatol* 2008;49:43-51.

Coll M, Martell M, Raurell I, Ezkurdia N, Cuenca S, Hernandez-Losa J, et al. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver International* 2010;30:593-602.

Coll M, Rodriguez S, Raurell I, Ezkurdia N, Brull A, Augustin S, Guardia J, Esteban R, Martell M, and Genesca J. Droxidopa, an Oral Norepinephrine Precursor, Improves Hemodynamic and Renal Alterations of Portal Hypertensive Rats. *Hepatology* 2012; 56: 1849-59.

Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiemermann C, Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol*, 2005; 146 : 498-505.

Collin S, Levy B. Pathophysiological mechanisms of vascular hyporesponsiveness in shock states *Réanimation* 2008; 17: 101-110.

Colombat M, Deleuze S, Callard P, Glomerular lesions in adult patients. *Nephrol Ther*, 2008; 4 (7) : 617-27.

De Backer D, Creteur J, Preiseir JC, Dubois MJ, Vincent JL, Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 166 (1) : 98-104.

De Backer, D, Hollenberg S, Boerma C, Goedgart P, Buchele G, Tascon-Ospina G, Dobbe I, Ince C, How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care*, 2007; 11 (5): R101.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*, 2008, 36(1) : 296-327.

Deplancke B, Gaskins HR. Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *Faseb J* 2003; 17(10):1310-1312.

Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster JR, Jr., DarleyUsmar VM, Kraus DW. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical biochemistry* 341(1):40-51.

Dombkowski R, Russel M, Schulman A, Doellman M, Olson K, Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005; 288 : R243-R252.

Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci* 2002; 65(1):18-25.

Drabek T, Kochanek PM, Stezoski J, Wu X, Bayir H, Morhard RC, Stezoski SW, Tisherman SA: Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. *Shock* 2011, 35:67-73.

Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT, Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol*, 1992; 72 : 259-65.

Duvoux C, Zanditenas D, Hezodec C. Effects of noradrenalin and albumin in patients with type I hepatorenal syndrome: a pilot study. *Hepatology* 2002; 36: 374-380.

Elbers PWG, Ince C. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care*. 2006;10(4):221.

Elbers PWG, Ince C. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care*. 2006;10(4):221.

Elenkov IJ, chrousos GP, Wilder RL, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol rev*.2000;52(4):595-638.).

Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia- reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 2007; 104 :15560-5.

Eppel GA, Bergström G, Anderson WP, Evans RG, Autoregulation of renal medullary blood flow in rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003; 284 : R233-R244.

Escorsell A, Bandi J C, Moitinho E, Feu F, Carcia-Pagan J C, Bosch J, Rodes J. Time profile of the haemodynamic effects of Terlipressine in portal hypertension. J of Hepatology. 1997;26:621-627.

Escorsell A, Ruiz Del Arbol L, Planas R, Albillos A, Banares R, Cales P, Pateron D,Bernard B, Vinel J, Bosch J. Multicenter randomized controlled trial of Terlipressine vs sclerotherapy in the treatment of acute variceal bleeding: The Test study Hepatology 2000. 32:471-476

Esmon CT, Taylor JB Jr , Snow TR, Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost*, 1991; 66 : 160-5.

Faller S, Ryter SW, Choi AM, Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury, *Anesthesiology*. 2010; 113 : 104-15.

Fan J, Kapus A, Marsden PA, Li YH, Oreopoulos G, Marshall JC, Frantz S, Kelly RA, Medzhitov R, Rotstein OD. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. J Immunol.2002;168:5252-5259.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology 2006;43:S99—112.

Feu F, Ruiz Del Arbol L, Banares R, Olanas R, Bosch J. Double blind randomized controlled trial comparing Terlipressine and somatostatin for acute variceal haemorrhage.Gastroenterology 1996; 11:1291-1299

Finberg JPM, Syrop HA, Better OS. Blunted pressor response to angiotensin and sympathomimetic amines in bile duct-ligated dogs. Clin Sci Mol Med 1981;61:535-9.

Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. Curr Opin Clin Nutr Metab Care.2002;5:167-174.

Fiorucci S, Distrurri E, Cirino G, Wallace JL, The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*, 2006; 131 : 259-271.

Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhemer JH, Suffredini AF Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 2003; 103 (7) : 2652-60.

Fort E, Sautereau D, Sylvain C, Ingrand P, Pillegand B, Beauchant M. A randomized trial of Terlipressin plus nitroglycerin vs balloon tamponade in the control of acute variceal haemorrhage. *Hepatology* 1990;11:678-681

Foster J.A and Curtiss S.W. The regulation of lung elastin synthesis. *Am J Physiol*.1990;259(2 Pt),L13-23.

Freeman JG, Barton J R,Record CO. Haemodynamic responses to 1,25 and 2 mg of Terlipressine intravenously in man. Aliment *Pharmacol Ther* 1988; 2:361-367

Friedman SL. Liver fibrosis — from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38(Suppl 1):S38—53.

Gadalla MM, Snyder SH, Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem*, 2010; 113 : 14-26.

Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Douay O, Loufrani L, Mercat A, Calès P, Radermacher P, Henrion D, Asfar P, Meziani F, Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics,

inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Crit Care*, 2010; 14 : R165.

Garcia –Compean D, Blanc P, Bories JM, Michel J, Desperez D, Pageaux JP, David XR, et al. Treatment of active gastro-oesophageal variceal bleeding with terlipressin or hemostatic balloon in patients with cirrhosis. A randomized controlled trial. *Arch Med Res* 1997 ;28:241-245

García-Tsao G. Bacterial translocation: Cause or consequence of decompensation in cirrhosis?. *J Hepatol*. 2001;34:150–5.

Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006;26:889–898.

Ghosh S, Choudhary N, Sharma K, Singh B, Kumar P, Agarwal R, Sharma N, Bhalla A, Chawla Y, Singh V. Noradrenaline vs. terlipressin in the treatment of type 2 hepatorenal syndrome: a randomized pilot study. *Liver Intern* 2013; 33: 1187-93.

Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express*. 12 nov 2007;15(23):15101-15114.

Golden PJ, Buchman TG. Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*.1996;24:1107-16.

Gonzalez RJ, Moore EE, Ciesla DJ, Biffl WL, Johnson JL, Silliman CC. Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming. *J Trauma*.2001;51:1069-1072.

Gordon S, Pattern recognition receptors : doubling up for the innate immune response. *Cell*, 2002 ; 111 (7) : 927-30.

Gougoux A, Physiologie des reins et des liquides corporels. Editions Multimondes. 2005; 1-336. Mimura I, Nangaku, The suffocating kidney : tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nature Rev Nephro*, 2010; 6 : 667-678.

Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA ; Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem*.1991;266(22):14147-50.

Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG, Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study the microcirculation. *Nat Med*, 1999; 5 : 1209-12.

Groszmann R J, Kravetz D, Bosch J, et al. Nitroglycerin improves the haemodynamic response to vasopressin in portal hypertension .*Hepatology* 1982; 2: 757-762

Gupta TK, Toruner M, Chung MK and Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998. 28, pp. 926Ŕ931.

Hadengue A, Gadano A, Moreau R, et al. Beneficial effects of a 2-day administration of terlipressin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrom. *J Hepatol* 1998;29:565-570

Hadengue A, Gadano, Giostra E, Moreau R, Valla D, Lebrec D. Terlipressin in the treatment of hepatorenal syndrome : A double blind crossover study.*Hepatology* 1995 ;22 (A236):165

Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin-1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:1085-93.

Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008; 7: 759-770.

Heckbert SR, Vedder NB et al. Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J Trauma 1998*; 45(3): 545-9.

Heitsch H, Brovkovych S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. Hypertension 2001;37:72–76.

Hélène V. Biologie et cirrhose, Elsevier Masson SAS revue francophone de laboratoires, 2006 ; N°385.

Henriksen JH, Moller S. Cardiac and systemic haemodynamic complications of liver cirrhosis. *Scand Cardiovasc J*. 2009; 43(4): 218-25.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 237(3):527-531.

Huang HC, Haq O, Utsumi T, Sethasine S, Abraldes JG, Groszmann RJ, et al. Intestinal and plasma VEGF levels in cirrhosis: the role of portal pressure. *J Cell Mol Med* 2012;16:1125–1133.

Huang YT, Tsai JF, Lin HC, Chen CF, and Hong CY. Hemodynamic effects of acute tetrandrine and terlipressin administration on portal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1997 ; 75: 1220-1225.

Huet O, Duranteau J, Endothelial dysfunction: involvement of reactive oxygen species, *Réanimation*, 2008; 17 : 387-92.

Hunter JP, Hosgood SA, Patel M, Rose R, Read K, and Nicholson ML. Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia–reperfusion injury. *British Journal of Surgery* 2012; 99: 1665–1671.

Ichai C, Giunti C, On which renal haemodynamic and renal function parameters can we act to protect the kidney? *Ann Fr Anesth Rea*, 2005; 24 : 148-60.

Ince C, Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level. *Am J Physiol*, 1993; 264 (2 Pt 2) : H294-301.

Ioannou G,Doust J, Rockey DC. Terlipressine for acute oesophageal variceal hemorrhage.The Cochrane Library ,Issue 3.2001

Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121–S131.

Iwakiri Y, Shah V and Rockey D.C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis-Current status and future directions.2014;61,912-924.

Jacob, 2003. Jacob M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 2003:195-202;57(5-6).

Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M.. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H2S gas biology. *Antioxidants & redox signaling* 2010; 13(2):157-192.

Kang KW, Choi SY, Cho MK, et al. Thrombin induces nitric-oxide synthase via Galpha12/13-coupled protein kinase C-dependent I-kappaBalpha phosphorylation and JNK-mediated I-kappaBalpha degradation. *J Biol Chem*.2003;278:17368-78.

Khan AAA, Schuler MM, PRIOR MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE: Effects of hydrogen sulphide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1990; 103: 482-90.

Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shephard AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portalhypertensive rats. *Am J Physiol* 1985; 248: Gl92-5.

Kiil F, Analysis of the tubuloglomerular feedback mechanism in renal autoregulation. *Acta Physiol Scand*, 2002; 174 : 357-66.

Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H, Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2006; 8 : 661-70.

Kinsella SM, Tuckey JP, Perioperative bradycardia and asystole: relationship to vasovagal syncope and the Bezole-Jarish reflex. *Br J Anaesth*, 2001; 86 (6) : 859-68.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB, The « no-reflow » phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 1974; 54 : 1496-1508.

Koenitzer J, Isbell S, Patel H, Beavides G, Dickinson D, Patel R, Darley-Usmar V, Lancaster J, Doeller J, Krauss D, Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O2-dependant manner. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*, 2007; 292 : H1953-H1960.

Koyama S, Aibiki M, Kanai K, Fujta T, Miyakawa K, Role of central nervous system in renal nerve activity during prolonged hemorrhagic shock in dogs. *Am J Physiol*, 1988; 254 (5 Pt 2) : R761-9.

Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S, The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens*, 2007; 25 (10) : 2100-4.

Laleman W, Omasta A, Van de Casteele M, Zeegers M, Vander Elst I, Van Landeghem L, et al. A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis. Hepatology 2005;42:1382-90.

Landry DW, Oliver JA, The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 2001; 345 (8) : 588-95.

Laplace C, Huet O, Vicaut E, Ract C, Martin L, Benhamou D, Duranteau J. Endothelial oxidative stress induced by serum from patients with severe trauma hemorrhage. *Intensive Care Med*. 2005;31(9);1174-80.

Leblanc I, Jacob L, Protection rénale. In: Zetlaoui P, Dartayet B, editors. Circulation régionale et agents vaso-actifs. 8th ed. MAPAR Bicêtre. 1997; 415-430.

Lee FY, Chu CJ, Wang SS, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Wu SL, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Inhibition of prostacyclin by indomethacin ameliorates the splanchnic hypoensitivity to glypressin in haemorrhage-transfused common bile duct-ligated rats. 2001; 31: 145-153.

Legrand M, Mik EG, Balestra GM, Lutter R, Pirracchio R, Payen D, Ince C, Fluid resuscitation does not improve renal oxygenation during hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology*, 2010; 112 : 119-27.

Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE,. Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms.*Blood.*1991;77:542-50.

Leone M, Bourgoin A, Antonini F, Albanèse J, Martin C, Which therapeutic propects in the septic syndrome? *Ann Fr Anesth Rea*, 2003; 22 : 798-808.

Lerolle N, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, Hill G, Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med*, 2010; 36 (3) : 471-8.

Levacher S, Letoumelin P, Pateron D et al. Early administration of Terlipressine plus glyceryl trinitrate to control active upper gastrointestinal bleeding in cirrhotic patients .*Lancer* 1995;346:865-868

Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.*1999;82:695-705

Levi M, Ten Cate H, Van der Poll T, Van Deventer SJH, Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA*, 1993; 270 : 975-9.

Li L, Rose P, Moore PK.. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2011; 51:169-187.

Li T, Zhao B, Wang C, Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008; 233 : 1081-7.

Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR, OPS imaging of human microcirculation: a short technical report. *J Vasc Res*, 2002; 39 (4) : 368-72.

Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC. A crucial role of GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in protal hypertension. Nature Med 2005;11:952-8

Lobb I, Zhu J, Liu W, Haig A, Lan Z. Hydrogen sulfide treatment ameliorates long-term renal dysfunction resulting from prolonged warm renal ischemia-reperfusion injury. *Can Urol Assoc J* 2014; 8(5-6): E413-8.

Lopez R, Roig F, Llinas MT, Salazar FJ, Role of cyclooxygenase-2 in the control of renal haemodynamics and excretory function. *Acta Physiol Scand*, 2003; 177 : 429-35.

Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology*.1996;23:1616–21.

Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, Bidani A, Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006; 290 : R1153-67.

Lowicka E, Beltowski J, Hydrogen sulfide (H2S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Re*, 2007; 59 : 4-24.

Lowicka E, Beltowski J, Hydrogen sulfide (H2S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Re*, 2007; 59 : 4-24.

Lynn M, Jeroukhimov I, Klein Y, Martinowitz U, Updates in the management of severe coagulopathy in trauma patients. *Int Care Med*, 2002; 28 (2) : S241-7.

Madorin WS, Martin CM, Sibbald WJ, Dopexamine attenuates flow motion in ileal mucosal arterioles in normotensive sepsis. *Crit Care Med*, 1999;27:394-400.

Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, Marzi I. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock*.2007;28:668-674.

Majid DS, Said KE, Omoro SA, Responses to acute changes in arterial pressure on renal medullary nitric oxide activity in dogs. *Hypertension*, 1999; 34 : 832-6.

Malpas SC, Evans RG, Head GA, Lukoshkova EV, Contribution of renal nerves to renal blood flow variability during hemorrhage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1998; 274 : R1283–R1294.

Martin C, Boisson C et al. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-(6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med* 1997; 25(11): 1813-9.

Martin C, Papazian L, Perrin G, Saux P, Gouin F, Norepinephrine or dopamine for the treatment of hyperdynamic septic shock? *Chest*, 1993, 103(6) :1826-1831.

Martin C, Riou B, Vallet B, Physiologie humaine appliquée. *Arnette*. 2006; 17 : 217-30.

Mattson DL, Lu SH, Roman RJ, Cowley Jr.AW, Relationship between renal perfusion pressure and blood flow in different regions of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1993; 264 : R578– R583.

Maxime V, Fitting C, Cavaillon JM, Annane D, Corticoids normalize leukocyte production of macrophage migration inhibitory factor in septic shock. *J Infect Dis*, 2005; 191 : 138-44.

Mayes PA: Phosphorylation oxydative et systèmes de transports mitochondriaux, Précis de Biochimie HARPER, les Presses de l'Université laval édition. Edited by Editions ESKA. 1989, pp122-34.

Minard FN, Grant DS, Hypothermia as a mechanism for drug-induced resistance to hypoxia. *Biochem Pharmacol*, 1982; 31(7) : 1197-203.

Mok YY, Atan MS, Yoke PC, Zhong JW, Bathia M, Moochhala S, Moore PK, Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol*, 2004; 143 : 881-889.

Molina PE, Bagby GJ, Stahls P. Hemorrhage alters neuroendocrine, hemodynamic, and compartment-specific TNF responses to LPS. Shock.2002;16:459-465

Moller S, Bendtsen F, Henriksen JH. Splanchnic and systemic hemodynamic derangement in decompensated cirrhosis. Can J Gastroenterol. 2001; 15(2): 94-106.

Moller S, Hansen EF, Brinch K, Henriksen JH, Bendtsen F. Central and systemic haemodynamic effects of Terlipressine in portal hypertensive patients. *Liver.* 2000;20:51-59.

Moller S. Systemic haemodynamics in cirrhosis and portal hypertension with focus on vasoactive substances and prognosis. *Dan Med Bull* 1998;45:1-14.

Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am.*1995; 75:257-277.

Morales D, Madigan J, Cullinane S, Chen J, Heath M, Oz M, Oliver JA, Landry DW, Reversal by vasopressin of intractable hypotension in the late phase of hemorrhagic shock. *Circ*, 1999; 100 (3) : 226-9.

Moreau R, Durand F, Poynard TH, Duhamel CH and al. Terlipressin in patients with cirrhosis and type I hepatorenal syndrome: A retrospective Multicenter Study. *Gastroenterology* 2002; 122:923-930

Moreau R, Lebrec D. The use of vasoconstrictors in patients with cirrhosis: type 1 HRS and beyond. *Hepatology* 2006;43:385-94.

Moreau R, Soubrane O, Hadengue A, et al. Haemodynamic responses to the administration of Terlipressine alone and combined with nitroglycerin in patients with cirrhosis.*Gastroenterol Clin Biol* 1992; 16:680-686

Moreau R. Hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:739-47.

Murphy G.J, Murphy G and Reynolds J.J. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett*:1991;289(1),4-7.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74(5): 1124-36.

Nakajima, Y., N. Baudry, et al. Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(8 Pt 1): 1526-30.

Nakayama S, Kramer GC, Carlsen RC, Holcroft JW. Infusion of very hypertonic saline to bled rats: membrane potentials and fluid shifts. *J Surg Res*.1985;38(2):180-6.

Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest*. 1986;137(10):3295-8.).

Nouette- Gaulain K, Quinart A, Letellier T, Sztark F : [Mitochondria in anaesthsia and intensive care]. *Ann Fr. Anesth. Reanim.* 2007; 26: 319-33.

Nystul T, Roth M, Carbon monoxide-induced suspended animation protects agains hypoxic damage in Caenorhabditis elegans. *PNAS*, 2004; 101(24) : 9133-9136.

Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int*. 2004;24:110–6.

Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H, Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, 2000; 164 : 558-61.

Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. Shock. 2000;14:409-414; discussion 414-405.

Orrego H, Medline A, Blendis LM, Rankin JG, Kreaden DA. Collagenisation of the Disse space in alcoholic liver disease. *Gut* 1979;20:673—9.

Ortega R, Gines P, Uriz J, Calahorra B and al .Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: Results of a prospective , nonrandomized study. Hepatology 2002; 36(4):942

Padilla P, Roth M, Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo, *PNAS*, 2001; 98(13) : 7331-7335.

Parks W.C, and Shapiro S.D. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*.2001;2(1),10-9.

Pascual JL, Khwaja KA, Ferri LE, Giannias B, Evans DC, Razek T, Michel RP, Christou NV. Hypertonic saline resuscitation attenuates neutrophil lung sequestration and transmigration by diminishing leukocyte-endothelial interactions in a two-hit model of hemorrhagic shock and infection. *J Trauma*.2003;54:121-130;discussion 130-122.

Pathophysiological mechanisms of vascular hyporesponsiveness in shock states. *Réanimation* 2008; 17: 101-110.

Persson PB, Renal blood flow autoregulation in blood pressure control. *Curr Opion Nephrol Hypertens*, 2002; 11 : 67-72.

Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells, Gastroenterology 110 (1996), pp. 534Ŕ548

Pizcueta MP, Casamitjana R, Bosch R, Rodes J. Decreased systemic vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats: role of hyperglucagonism. *Am J Physiol* 1990; 258: G191-5.

Pockros, PJ, Reynolds, TB.Rapid diuresis in patients with ascites from chronic liver disease: The importance of peripheral edema.*Gastroenterology* 1986; 90:1827.

Polderman KH, Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*, 2008 ; 371 : 1955-69.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P, The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825—32.

Prathapasinghe GA, Siow YL, O K. Detrimental role of homocysteine in renal ischemia–reperfusion injury.*AmJ Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1354–63..

Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJ, Eggo MC. Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *American journal of physiology* 2006; 291(2):G288-296.

Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1992; 32:109-134.

Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993;92:1795—804.

Roesner, J. P., D. A. Vagts, et al. Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats. *Intensive Care Med* 2006; 32(10): 1649-57.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK, Immunité anti-bactérienne et antifungique. Immunologie clinique, 4ème édition. Bruxelles ; De Boek Université ; 1997 : 223-35.

Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, Hunt BJ, Komadina R, Nardi G, Neugebauer E, Ozier Y, Riddez L, Schultz A, Stahel PF, Vincent JL, Spahn DR. Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. *Critical Care* 2010; 14: R52.

Ryan J, Krishnankutty S, Jennings G, Elser M, Dudley F. Impaired reactivity of the peripheral vasculature to pressor agents in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;105:1167-72.

Salzman AL, VromenA, Denenberg A, Szabo C, K(ATP)-channel inhibition improves hemodynamics and cellular energetics in hemorrhagic shock. *Am J Physiol*, 1997; 272 (2 Pt2) : H688-94.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8258–8263.

Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP, HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*, 2002; 123 (3) : 790-802.

Sarkis A, Liu KL, Lo M, Benzoni D, Angiotensin II and renal medullary blood flow. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002; 284 : F365-F372.

Sawadogo A, Dib N, Calès P. Physiopathology of cirrhosis and its complications.*Réanimation* 2007; 16: 557-562,.

Schadt JC, Ludbrook J, Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol*.1991;260: H305-318.

Schlichtig R, Kramer DJ, Pinski MR. Flow redistribution during progressive hemorrhage is a determinant of critical O2 delivery. *J App Phsiol*. 1991;70:169-78.

Schwartz MD, Repine JE, Abraham E. Xanthine oxidase-derived oxygen radicals increase lung cytokine expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Respir Cell Mol Biol*.1995;12:434-440.

Senior R.M, Griffin G.L, Fliszar C.J, Shapiro S.D, Goldberg G.L, and Welgus H.G. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem*.1991; 266(12): 7870-5.

Sethi AK, Sharma P, Mohta M, Tyagi A, Shock – a short review. *Indian J Anaesth*, 2003; 47 (5) : 345-359.

Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina P, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-8

Sharma P, Kumar A, Sharma BC, Sarin SK. An open label, pilot, randomized controlled trial of noradrenaline versus terlipressin in the treatment of type 1 hepatorenal syndrome and predictors of response. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1689-97.

Sharpe MA, Cooper CE. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem*.1998;273:30961-30972.

Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeau A et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*.2003;362:1799-805.

Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* 1985;5:643—8

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H.. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. Journal of biochemistry 146(5):623-626. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling* 2009a; 11(4): 703-714.

Siberngal S ; Lang F. Atlas de poche de physiopathologie Ed. Flammarion, paris 2000; 11: 172-173

Sieber CC, Groszmann RJ. In vitro hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am J Physiol* 1992;262:G996-1001

Silva C, Ines LS, Nour D, et al. Differential male and female adrenal cortical steroid hormone and cortisol responses to interleukin-6 in humans. *Ann N Y Acad Sci*.2002;966:68-72.

Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Stahl B, Wachter U, Vogt J, Speit G, Hauser B, Moller P, Calzia E, Szabo C, Schelzig H, Georgieff M, Radermacher P, Wagner F, Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *Shock*, 2011; 35 (2) : 156-63.

Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptative, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation.*Lancet.*2004;364:545-8.

Singh P, Thomson SC, Renal homeostasis and tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010; 19 (1) : 59-64.

Singh V, Ghosh S, Singh B, Kumar P, Sharma N, Bhalla A, Sharma AK, Choudhary NS, Chawla Y, Nain CK. Noradrenalin vs. terlipressin in the treatment of hepatorenal syndrome: A randomized study. J Hepatol 2012; 56: 1293-98.

Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*, 2009; 31 : 267-74.

Solanki P, Chawla A, Garg R, Gupta R, Jain M,Sarin S K. Beneficial effects of terlipressin in hepatorenal syndrome: A prospective ,randomized placebo-controlled *clinical trial. J of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18:152

Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*.2004;8:462-8.

StadlbauerKH, Wagner-Berger HG, Raedler C, Voelckel WG, Wenzel V, Krismer AC, Klima G, Rheinberger K, Nussbaumer W, Pressmar D, Lindner KH, Konigsrainer A, Vasopressin, but not fluid resuscitation, enhances survival in a liver trauma model with uncontrolled and otherwise lethal hemorrhagic shock in pigs. *Anesthesiology*, 2003; 98 (3) : 699-704.

Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH, Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg*, 1987; 122 (1) : 62-8.

Stewart RM, Myers JG, Dent DL, Ernis P, Gray GA, Villarreal R, Blow O, Woods B, McFarland M, Garavaglia J, Root HD, Pruitt BA Jr, Seven hundred fifty-three consecutive deaths in a level I trauma center: the argumant for injury prevention. *J Trauma*, 2003; 1 : 66-70, discussion 70-1.

Szabo C, Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug*, 2007.

Takala J. Dterminants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth* 1996;77.

Tamion F, Richard V, Lacoume Y, Thuillez C. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1. Am *J Physiol Gastrointest Liver Physiol.2*002;283: G408-414.

Taoka S, Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine betasynthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *Journal of inorganic biochemistry* 2001; 87(4):245-251.

Terada LS. Oxidative stress and endothelial activation. *Crit Care Med*.2002;30:S186-191.

Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PA, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiermermann C, Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest*, 2008; 88 : 1038-48.

Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ, Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99 (19) : 12351-6.

Vachiery F, Moreau R, GadanoA, et al.Hemodynamic and metabolic effects of Terlipressine in patients with cirrhosis receiving a non selective beta- blocker.Dig Dis Sci 1996 ; 41:1722-1726

Valla D, Lee S S, Moreau R, Hadengue A, Sayegh, Leberec. Effects de la terlipressine sur les circulations splanchnique et systémique des malades atteints de cirrhose. Gastroenterology Clin Biol.1985;9:877-880.

VallaD, Lee S S , Moreau R, Hadengue A, Sayegh,Lebrec. Effets de la terlipressine sur les circulations splanchnique et systémique des malades atteints de cirrhose .*Gastroenterology Clin Biol* 1985 ; 9 :877-880

Vallet B, Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med*, 2002; 30 (5Suppl) : S229-34.

Vallon V, Mühlbauer B and Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev.*2006;86:901-40.

Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, Van Vlierberghe H, De Vos F, Olievier K, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;137:e2111–e2116.),

Vatner SF, Effects of hemorrhage on regional blood flow distribution on dogs and primates. *J Clin Invest*, 1974; 54 (2) : 225-35.

Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE, Derangement of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*, 1998; 24 (1) : 33-44.

Vosmik J, Jedlika, Mulder, Cort; Action of the triglycyl hormonogen of vasopressin (Glypressine) in patients with liver cirrhosis and bleeding oesophageal varices. *Gastroenterology* 1977;72:605-609.

Waage A, Espevik T, Lamvik J, Detection of tumour necrosis factor-like cytotoxicity in serum from patients with septicaemia but not from untreated cancer patients. *Scand J Immunol*, 1986; 24 (6) : 739-43.

Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabó C, Hydrogen sulfide – the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit Care*, 2009; 13(3) : 213.

Wagner K, Georgieff M, Asfar P, Calzia E, Knoferl MW, Radermacher P, Of mice and men (and sheep, swine, etc.): the intriguing hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide (H2S). *Crit Care*, 2011; 15 : 146.

Walker S, Kreichgauer HP , Bode JC. Terlipressine versus somatostatin in the treatment of bleeding oesophageal varices –final report of a placebo-controlled, double-blind study.Zeitschrift fur Gastroenterology 1996;34:692

Wang R, Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*, 2002; 16 : 1792-1798.

Wang TS, Deng JC, Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med*, 2008; 86 : 495-506.

Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP, Acute hydrogen sulfide poisoning: Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol*,1989; 38 : 973-81.

Werb Z. Proteinases and matrix degradation. In. Textbook of Rheumatology, edited by W.N Kelley, ED. Harris Jr, Sruddy and C.B Sledge. Philadelphia, PA:Saunders;1989,300-321

Wiggers CJ, Basic hemodynamic principles essential to interpretation of cardiovascular disorders. *Bull N.Y Acad Med*, 1942; 18 (1) : 3-17.

Xia M, Chen L, Muh RW, Li PL, Li N, Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009; 329 : 1056-62.

Xu Z, Prathapasinghe G,WuN, Hwang SY, Siow YL, Ischemia–reperfusion reduces cystathioninebeta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2009; 297: F27-35.

Yalamanchili C, Smith MD. Acute hydrogen sulfide toxicity due to sewer gas exposure. *Am J Emerg Med* 2008; 26: 518 e5-7.

Yang G, Sun X, Wang R, Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J*, 2004; 18 : 1782-4.

Yang G, Wu L, Wang R, Pro-apoptotic effect of endogenous H2S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB J*, 2006; 20 : 553-5.

Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ, Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004; 101 (1) : 296-301.

Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP, IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003; 285 : G621-9.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocytemediated inflammation. *FASEB J*, 2006; 20 : 2118-20.

Zhang H, Bhatia M, Hydrogen sulfide: a novel mediator of leukocyte activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 2008; 30 : 631-45 [01].

Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M, Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 2008; 181 : 4320-31 [02].

Zhang H, Zhi L, Moochhala S, Moore PK, Bathia M, Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulation the production of cytokines and chemokines via NF-κB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007; 292 : 960-71.

Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(6):L1193-1201.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R, The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.*EMBO J*, 2001; 20 : 6008-16.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R, The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.*EMBO J*, 2001; 20 : 6008-16.

Zhi L, Ang A, Zhang H, Moore PK, Bathia M, Hydrogen sulfide induces the synthesis proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-□B pathway. *J Leukoc Biol*, 2007; 71 : 1322-32.

Zhong GZ, Li YB, Liu XL, Guo LS, Chen ML, Yang XC. Hydrogen sulfide opens the KATP channel on rat atrial and ventricular myocytes. Cardiology 2010; 115(2):120-126.

l'université nantes angers le mans

PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

Maher TABKA

Les effets des substances vasoactives sur les perturbations hémodynamiques systémiques et splanchniques induites par les états de choc et la cirrhose.

Assessment of vasoactive substances effects on hemodynamic systemic and splanchnic impairments caused by shock states and cirrhosis.

Résumé

La dysfonction des mécanismes de régulation vasculaire, observée dans les états de choc septique (CS), hémorragique (CH) et la cirrhose (C), remet en question l'efficacité des substances vasoactives utilisées. L'objectif de ce travail est l'évaluation hémodynamique, systémique et splanchnique de l'administration d'hydrogène sulfuré [H_2S], de terlipressine [TP] et de noradrénaline [NE] au cours des complications des CS, CH et C.

Suite à une ischémie/reperfusion (I/R) chez le rat, le sepsis n'a pas d'impact particulier sur le rein, lors de la phase précoce, alors que le débit rénal varie en réponse aux variations de pression artérielle, incluant le phénomène d'autorégulation. Le CS est associé très précocement à une augmentation du flux sanguin dans les capillaires péritubulaires et à une dysfonction rénale limitée par la perfusion de NE.

Au cours d'un CH retransfusé et réanimé par un remplissage vasculaire, l'inhibition endogène de H_2S aggrave la dysfonction rénale suite à une diminution des vitesses microcirculatoires péritubulaires et favorise un syndrome de fuite capillaire. A l'inverse, l'administration exogène de H_2S pourrait provoquer un rétrocontrôle négatif sur l'activité de l'enzyme principale de production de H_2S endogène, la CSE.

Lors d'une hypertension portale par C chez le rat, la NE augmente la pression porte à faibles doses et augmente la contraction maximale des veines portes in vitro par rapport à la vasopressine, ce qui augmente le risque hémorragique. Au contraire, la TP diminue le débit mésentérique et la pression porte, ce qui favorise la réponse hémodynamique de réduction du risque d'hémorragie digestive.

Mots clés

ischémie/reperfusion, choc hémorragique, choc septique, cirrhose, hypertension portale, sulfure d'hydrogène, noradrénaline, terlipressine, microcirculation, paramètres hémodynamiques.

Abstract

The impairment of vascular regulatory mechanisms observed in cirrhosis and shock situations, reduces the effectiveness of vasoactive substances used in treatments. The aim of this study is the hemodynamic, systemic and splanchnic assessments of vasoactive molecules proposed for the treatment of septic shock, hemorrhagic shock and cirrhosis complications (hydrogen sulfide [H2S], terlipressin [TP] and norepinephrine [NE]).

In a model of ischemia/reperfusion (I/R), sepsis has no particular impact on the kidney since renal blood flow varies in response to mean arterial blood pressure variations, including an auto-regulation phenomenon. Sepsis is very rapidly associated with hypervelocity of blood flow in peritubular capillaries and renal dysfunction, both of wich are reserved by NE infusion.

In hemorrhagic shock model controlled and resuscitated by Gelofusin® perfusion, we demonstrated that inhibition of endogenous H_2S worsening renal dysfunction due to decreased renal peritubular microcirculatory velocities and promotes capillary leak syndrome. While the exogenous administration of H_2S, could cause a negative feedback on the activity of the principal enzyme of endogenous H_2S production, the CSE.

During portal hypertension by cirrhosis in rats, NE increases the portal venous pressure, at low doses, and is more efficient than vasopressin on the portal veins of cirrhotic rats in vitro. However TP significantly reduces the mesenteric artery blood flow and the portal vein pressure. Taken together, TP could reduce the variceal bleeding risk associated with cirrhosis in comparison to NE.

Key Words

ischemia/reperfusion, hemorrhagic shock, septic shock, cirrhosis, portal hypertension, hydrogen sulfide, norepinephrine, terlipressin, microcirculation, hemodynamic systemic and splanchnic circulation, vascular reactivity and variceal bleeding