

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER

FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2016

2016 TOU3 1527

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Benoit RICHARD

le 21 AVRIL 2016

**Etude de la mortalité et impact tissulaire du blocage aigu du
Récepteur B2 de la bradykinine dans un modèle murin de
choc hémorragique aigu à objectif de volume**

Directeur de thèse : Dr MAYEUR Nicolas

JURY

Monsieur le Professeur Thomas GEERAERTS	Président
Monsieur le Professeur Bertrand MARCHEIX	Assesseur
Monsieur le Professeur Vincent BOUNES	Assesseur
Monsieur le Docteur Nicolas MAYEUR	Assesseur
Madame le Docteur Hélène CHARBONNEAU	Suppléant
Monsieur le Docteur Antoine ROUGET	Membre invité

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2014

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. CLAUDX	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. ARNE JL
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER G.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. GOUZI		
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU		
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER		
Professeur Honoraire	M. PASCAL		

Professeurs Émérites

Professeur LARROUY	Professeur JL. ADER
Professeur ALBAREDE	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur CONTE	Professeur L. LARENG
Professeur MURAT	Professeur F. JOFFRE
Professeur MANELFE	Professeur J. CORBERAND
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. AMAR J.	Thérapeutique	M. BIRMES Ph.	Psychiatrie
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie	M. BROUCHET L.	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. AVET-LOISEAU H	Hématologie, transfusion	M. BUREAU Ch	Hépatogastro-entéro
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)	M. CALVAS P.	Génétique
M. BONNEVILLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire	Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. BRASSAT D.	Neurologie	M. CHAIX Y.	Pédiatrie
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie pathologique	Mme CHARPENTIER S.	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BUGAT R. (C.E)	<i>Cancérologie</i>	M. COGNARD C.	Neuroradiologie
M. CARRIE D.	Cardiologie	M. DE BOISSEZON X.	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie	M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie	M. FOURNIÉ P.	Ophthalmologie
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie	M. GAME X.	Urologie
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie et réanimation chir.
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
M. DEGUINE O.	O. R. L.	M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie	M. LAUWERS F.	Anatomie
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique	M. LEOBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. FOURCADE O.	Anesthésiologie	M. MAZIERES J.	Pneumologie
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.	M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. IZOPET J. (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLIVOT J-M	Neurologie
Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique	M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale	M. PARIENTE J.	Neurologie
M. LANGIN D.	Nutrition	M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. LAUQUE D. (C.E)	Médecine Interne	M. PAUL C.	Dermatologie
M. LIBLAU R. (C.E)	Immunologie	M. PAYOUX P.	Biophysique
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie	M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. MALAVAUD B.	Urologie	M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique	M. PERON J.M.	Hépatogastro-entérologie
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses	M. RONCALLI J.	Cardiologie
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique	M. SANS N.	Radiologie
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie	Mme SAVAGNER F.	Biochimie et biologie moléculaire
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique	Mme SELVES J.	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme MOYAL E.	Cancérologie	M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie		
M. OLIVES J.P. (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie		
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PERRET B (C.E)	Biochimie		
M. PRADERE B. (C.E)	Chirurgie générale		
M. RASCOL O.	Pharmacologie		
M. RECHER Ch.	Hématologie		
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE D. (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile		
M. SALLES J.P.	Pédiatrie		
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON N.	Médecine Légale		
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépatogastro-entérologie		
		P.U.	
		M. OUSTRIC S.	Médecine Générale

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr. MESTHÉ P.

P.U. - P.H.		P.U. - P.H.	
Classe Exceptionnelle et 1ère classe		2ème classe	
M. ACAR Ph.	Pédiatrie	M. ACCADBLE F.	Chirurgie Infantile
M. ALRIC L.	Médecine Interne	Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne	M. ARBUS Ch.	Psychiatrie
M. ARNAL J.F.	Physiologie	M. BERRY A.	Parasitologie
Mme BERRY I.	Biophysique	M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale	M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
M. BUSCAIL L.	Hépto-Gastro-Entérologie	Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie	M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CARON Ph. (C.E)	Endocrinologie	M. CHAUFOR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique	M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive	M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique
Mme COURTADE SAIDI M.	Histologie Embryologie	M. COURBON	Biophysique
M. DELABESSE E.	Hématologie	M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
Mme DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie	M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DIDIER A.	Pneumologie	M. DELORD JP.	Cancérologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie	M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GALINIER M.	Cardiologie	M. GARRIDO-STÔWHAS I.	Chirurgie Plastique
M. GERAUD G.	Neurologie	Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire	M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
M. GOURDY P.	Endocrinologie	Mme GUIMBAUD R.	Cancérologie
M. GRAND A. (C.E)	Epidémi. Eco. de la Santé et Prévention	M. HUYGHE E.	Urologie
Mme HANAIRE H. (C.E)	Endocrinologie	M. LAFOSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. KAMAR N.	Néphrologie	M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. LARRUE V.	Neurologie	M. MARCHEIX B.	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie	M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
M. LEVADE T.	Biochimie	Mme MAZEREEUW J.	Dermatologie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophtalmologie	M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène	M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses	M. OTAL Ph.	Radiologie
M. PLANTE P.	Urologie	M. ROLLAND Y.	Gériatrie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile	M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. RITZ P.	Nutrition	M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie	M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. ROSTAING L (C.E).	Néphrologie	M. TACK I.	Physiologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale	M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. ROUSSEAU H.	Radiologie	M. VERGEZ S.	O.R.L.
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie	Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie		
M. SENARD J.M.	Pharmacologie		
M. SERRANO E. (C.E)	O. R. L.		
M. SOULIE M.	Urologie		
M. SUC B.	Chirurgie Digestive		
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie		
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie		

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr VIDAL M.
Professeur Associé en O.R.L
WOISARD V.

A mon Maître et Président du jury,

**Monsieur le Professeur Thomas GEERAERTS,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse, acceptez pour cela mes plus sincères remerciements.

Votre investissement au service de la recherche et de la médecine est un exemple.

Je serai heureux de continuer à apprendre à vos côtés.

Je vous prie de recevoir l'assurance de ma respectueuse considération.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Bertrand MARCHEIX,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier en Chirurgie Cardiaque**

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury de thèse et de juger mon travail.

Votre technique et votre aisance chirurgicale forcent l'admiration.

J'espère avoir un jour la possibilité de continuer à progresser à vos côtés.

Je vous prie de recevoir l'assurance de ma respectueuse considération.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Vincent BOUNES,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury de thèse et de juger mon travail.

Un immense merci pour avoir répondu favorablement à mon invitation tardive.

Votre professionnalisme et votre accessibilité font honneur à notre spécialité.

Veillez croire en mon respect le plus profond et à ma reconnaissance.

A mon Maitre et directeur de thèse,

**Monsieur le Docteur Nicolas MAYEUR,
Praticien Hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Je te remercie d'avoir accepté d'encadrer mon travail.

Le perfectionnement avec lequel tu mènes tous tes projets est un exemple.

Je regrette de n'avoir pas eu l'occasion de travailler en service à tes côtés.

Je te prie de recevoir l'assurance de ma respectueuse considération.

A mon Maître,

**Madame le Docteur Hélène CHARBONNEAU,
Praticien hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Je te remercie d'avoir accepté d'encadrer mon travail.

Ta persévérance mise au service de ta connaissance font de toi quelqu'un d'exceptionnel.

J'aurais été heureux de continuer à apprendre à tes cotés.

Je te souhaite beaucoup de bonheur pour ton nouveau départ, nous te regretterons.

A mon Maître,

**Monsieur le Docteur Antoine ROUGET,
Praticien hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail.

Ta bonne humeur communicative est le ciment indispensable à toute équipe de réanimation.

Merci pour toutes ces belles astreintes, ces contre visites professorales et ces consultations sénorisées.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Olivier FOURCADE,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Votre dynamisme et votre rigueur quotidienne forcent l'admiration.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'accordez.

Veillez croire en mon respect le plus profond et à ma reconnaissance.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Vincent MINVILLE,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier en Anesthésie-Réanimation**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de master 2.

Je vous suis reconnaissant pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés aussi bien en service d'orthopédie que durant nos gardes.

Veillez croire en mon respect le plus profond et à ma reconnaissance.

A ma famille,

A Anaïs, ma femme, nous sommes tellement semblables mais nous nous complétons tellement bien. Tu as su rendre chacun de nos instants inoubliables et sublimer notre amour. Je souhaite que notre passion passe les années et que notre famille s'épanouisse.

A mon fils Augustin, je m'émerveille jour après jour de te voir grandir. Je serai toujours présent pour t'apporter amour et attention. Tu es devenu mon essentiel dans cette vie bien remplie.

A ma mère, ton dévouement au service des autres a été un véritable exemple, tu nous as tenu la main jour après jour sur le chemin de la vie, nous te serons à jamais reconnaissant de tout l'amour que tu nous as prodigué.

A mon père, ton amour nous a aidé à grandir. Tes valeurs ont été les fondations de notre épanouissement actuel.

A mon frère Romain, ta persévérance et ton audace sont un exemple de courage, tu as aujourd'hui trouvé le bonheur que tu mérites.

A mon frère Olivier, ta venue sur Toulouse avec ta petite famille nous emplit de bonheur, puissent nos enfants grandir ensemble comme nous avons eu le bonheur de le faire.

A mes belles-sœurs Claudia et Laura, vos sourires illuminent notre famille, merci pour le bonheur que vous distillez chaque jour.

A ma mamie, pour ton dynamisme, tu es une vraie star pour ceux qui t'entourent.

A mes grands-parents, partis trop tôt, je pense à vous en ce jour.

A mes beaux-parents ainsi qu'à Camille, Pauline, Justine et Paul qui m'ont accueilli dès le premier jour au sein de leur famille.

A Françoise, notre seconde maman.

A mes amis,

A Emilie et Nicolas, je suis fier d'être le parrain de votre beauté, je te promets Nico de ne jamais faiblir sur les trails à venir.

A Mathieu, pour ton amitié fidèle et tous les moments passés à llança. Que de beaux souvenirs partagés et de poils épilés.

A Fanny et Cédric, pour votre dynamisme et votre générosité quotidienne. Merci d'avoir été mon mentor en tunning.

A Julien, exilé sur les terres de Ségolène, on te préfèrerait à la maison.

A Aurore et Sébastien, pour votre courage et votre joie de vivre. Vous êtes une leçon de vie.

A Manu et Lucille, le roi de la cachole, toujours présent pour nous faire rire.

A Christophe, ludiverbiste de la première heure.

A Audrica et Benoit, pour notre amour partagé pour les voyages.

A Aurélie, Nous sommes heureux de te retrouver sur Toulouse après cet exil chez les Chtis.

A Apolline, Yaël, Timéo et Louise, et à ceux à venir, soyez aussi amis que nous.

A Aurore Taylor, pour ton indéfectible amitié et tes beaux discours aux mariés.

A mes Confrères et collègues,

A mes co-internes, **Hélène et Bénédicte** tant de fous rires partagés, au **Dr Gomez** la meilleure urgentiste du 81, **Céline** avec qui nous avons ouvert et fermé le bal de l'internat, **Olivier** qui m'a bien rempli la cafetière cette année, mes amis de master 2 **Marine, Louis, Amélia et François**, mes co-internes de réanimation, **Romain, Thibaut, Caroline, Stéphanie, Samuel, Jean jacques, Xavier, Jeremy, Pierre, Marion, Marie-Agnès et Aline**. A tous ceux de la promotion 2010 et ceux avec qui j'ai partagé du temps en stage, **Valentin, Gaëlle et Claire**.

A mes chefs et anciens chefs, qui m'ont tant appris.

Claude Gris, pour ton paternalisme et ton esprit d'équipe.

François Gaussiat, pour ton encadrement lors de mes premiers pas d'interne.

Laure Crognier, pour tes exceptionnelles qualités médicales et humaines.

Thierry Seguin, pour m'avoir appris à ne pas chélater les patients.

Bernard Georges, pour votre présence bienveillante, merci de nous accompagner avec tant de justesse et de patience dans nos difficultés quotidiennes.

Jean-Marie Conil, pour m'avoir accompagné dans l'écriture de mon CER.

Stéphanie Ruiz, pour notre amour immodéré pour les souris.

Pierre Cougot, pour ces délicieuses réunions matinales.

Pascal Sanchez, pour ton caractère pétillant et ton éternel optimisme.

Julia Grossac que j'ai pu suivre durant ses premiers pas de senior, que de chemin parcouru.

Nicolas Larrieu, pour cette fabuleuse année de voyages épicuriens à Bordeaux.

Béatrice Riu et Stein Silva, pour votre engagement dans la formation des plus jeunes et votre accessibilité.

Edith et Thierry qui nous ont tant appris.

Marie Buléon, qui m'a tant apporté durant mon année de master 2.

Pour mes chefs d'anesthésie et de réanimation de Tarbes, **Paul Galibert et Thierry Dulac** qui ont toujours été présent.

A toutes les **infirmières, aides-soignantes, secrétaires, IADE**, pour votre aide quotidienne.

A nos **patients**, sans qui rien de tout cela n'aurait de sens

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	19
2	MATERIELS ET METHODES	21
2.1	Expérimentation animale	21
2.1.1	Schéma expérimental.....	21
2.1.2	Description du choc hémorragique à objectif de volume.....	22
2.2	Sacrifice des animaux.....	23
2.3	Paramètres étudiés (Seconde partie du travail).....	24
2.3.1	Etude de la fonction rénale et hépatique.....	24
2.3.2	Analyse en RTPCR quantitative	24
2.3.3	Analyse histologique	26
2.3.4	Analyse statistique	26
3	RESULTATS.....	27
3.1	Première partie du travail : MORTALITE	27
3.2	Seconde partie du travail : IMPACT TISSULAIRE	28
3.2.1	Caractéristiques des groupes	28
3.2.2	Conséquences fonctionnelles	29
4	DISCUSSION	33
5	CONCLUSION.....	36
6	PERSPECTIVE : Etude AIEC	37
	BIBLIOGRAPHIE	42

ABREVIATIONS

Ac : anticorps

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ALI : acute lung injury

ALAT : Alanine aminotransferase

ARA 2 : Antagoniste des recepteurs de l'angiotensine 2

ARN : Acide Ribonucleique

ASAT : Aspartate AminoTransférase

BK : bradykinine

BNP : Peptide Natriurétique de type B

CIVD : coagulation intra vasculaire disséminée

DFG : débit de filtration glomérulaire

FEVG : Fraction d'ejection du ventricule gauche

HE : hématoxyline éosine

HGF : hepatic growth factor

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion

IL : interleukine

IRA : insuffisance rénale aigue

KIM-1 : kidney inducible molecule 1

LDH : lactate deshydrogenase

MODS :multi -organ dysfunction syndrome

NO : monoxyde d'azote

NTAI : nécrose tubulaire rénale aigue ischémique

PAM : pression artérielle moyenne

PAS : periodic acid schiff

RB1 : récepteur B1 de la bradykinine

RB2 : récepteur B2 de la bradykinine

RTPCR : reverse transcriptase PCR

SIRS : systemic inflammation reponse syndrome

SKK : système kalllicréine-kinine

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

WB : western blot

ZO1 : zonula occludens 1

1 . INTRODUCTION

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle (1), de l'insuffisance cardiaque et des maladies rénales chroniques (2). Cependant, les IEC peuvent induire des hypotensions artérielles sévères en cas d'anesthésie avec pour conséquence l'augmentation du taux d'insuffisance rénale et de la mortalité (2-4).

Les recommandations des autorités sanitaires préconisent majoritairement l'arrêt de ces traitements dans les 48 heures précédant une anesthésie générale. Cela n'est cependant pas toujours réalisable et il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapeutique spécifique permettant une antagonisation des IEC en situation d'urgence chirurgicale. Ainsi les situations nécessitant une anesthésie générale en urgence sont à haut risque de morbi-mortalité hypotensive, d'autant plus lorsqu'un état de choc est déjà installé.

Les effets pharmacologiques des IEC sont médiés par le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et par le système kinine-kallicréine (SKK) (5). En effet, les IEC induisent une inhibition de la synthèse de l'angiotensine II empêchant la mise en jeu de son action vasoconstrictrice et l'inhibition de la dégradation de la bradykinine par l'enzyme de conversion. Ce mécanisme aboutit à l'augmentation de biodisponibilité de la bradykinine qui détermine un surcroît d'activité de son récepteur B2 (RB2) à l'origine d'une vasodilatation majeure par la formation de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandines (5).

De manière intéressante, un antagoniste spécifique du RB2 (HOE-140, Icatibant, Firazyr®, Shire Orphan Therapies GmbH) a été approuvé en 2001 par la food and drug administration dans le traitement de l'oedème angioneurotique. Il a également été montré que l'HOE-140 pouvait, en situation chronique, corriger les effets hypotenseurs des IEC chez l'homme (6).

Lors d'un choc hémorragique il se produit une redistribution du flux sanguin au profit des organes vitaux et au détriment d'autres territoires moins bien autorégulés (7). Le nombre de défaillance d'organe est ainsi un marqueur pronostic essentiel dans les différents états de choc (8). Parmi l'ensemble des organes, le rein, le tube digestif et le foie sont des marqueurs validés de la gravité d'un état de choc.

En premier lieu, un état de choc détermine une altération de la fonction rénale et sa

défaillance est un marqueur pronostic robuste (9–11). En second lieu, les lésions ischémiques consécutives au choc au sein de la muqueuse digestive entraînent d'une part une porosité de la barrière intestinale avec translocation bactérienne et d'autre part une libération majeure d'interleukines. Ces deux mécanismes entraînent un syndrome de réponse inflammatoire systémique majeur (SIRS). Le tube digestif est ainsi à la fois un marqueur mais également un acteur précoce de l'état de choc.

Enfin, la glande hépatique présente une double dépendance circulatoire, sa perfusion provenant pour 25% de l'artère hépatique et pour 75% de la veine porte. La circulation portale provenant de la rate, de l'intestin et du pancréas participe donc de manière prépondérante à la vascularisation hépatique. L'atteinte du système splanchnique pendant un état de choc entraîne en conséquence une altération des fonctions métaboliques et hémostatiques hépatiques.

Dans un précédent travail de notre équipe concernant les interactions entre le SRAA et le SKK, nous avons étudié l'impact de l'HOE-140 sur les effets hypotenseurs des IEC dans 2 modèles murins de choc hémorragique (12) : 1) un modèle de choc hémorragique à objectif de pression pour évaluer l'effet hémodynamique et 2) un modèle de choc hémorragique à objectif de volume pour évaluer l'effet métabolique.

Ces travaux avaient mis en évidence d'une part l'effet hypotenseur propre des IEC en situation de choc, et d'autre part, que le blocage du RB2 par une injection d'HOE-140 au moment de l'anesthésie permettait de restaurer la pression artérielle des souris choquées traitées au long court par IEC au même niveau que celles sans IEC. L'HOE-140 permettait également, dans le modèle à objectif de volume, de diminuer les signes indirects d'hypoxie tissulaire (lactatémie) des souris prétraitées par IEC en comparaison aux souris sous IEC non antagonisées.

Cependant, l'impact du blocage aigu du RB2 sur la mortalité dans notre modèle de choc hémorragique à objectif de volume ainsi que son éventuel retentissement sur les défaillances d'organes restent inconnus. A notre connaissance aucune étude animale ne permet de conclure.

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer les conséquences sur la mortalité et sur la défaillance multi-organique de la prémédication par IEC et l'éventuel effet d'une antagonisation du RB2 par l'HOE-140 lors d'un état de choc hémorragique murin.

2 . MATERIELS ET METHODES

2.1 . Expérimentation animale

2.1.1 . Schéma expérimental

Première partie du travail :

Des souris femelles âgées de 18-25 semaines de la souche C57 BL6 ont été séparées en 3 groupes (n=16) :

- ✓ **Contrôle (n= 5)** : souris anesthésiées et choquées.
- ✓ **IEC (n= 6)** : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours (Ramipril 1 mg/kg/j) dans les biberons d'eau.
- ✓ **IEC + HOE-140 (n= 5)** : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours (Ramipril 1 mg/kg/j) et bloquées par l'HOE-140 (1 injection sous cutanée de 250 µg/kg) juste avant le début du choc.

Seconde partie du travail :

Des souris femelles âgées de 18-25 semaines de la souche C57 BL6 ont été séparées en 5 groupes (n=50) :

- 1. Sham (n= 10)** : souris anesthésiées, non choquées.
- 2. Contrôle (n= 9)** : souris anesthésiées et choquées.
- 3. IEC (n= 11)** : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours (Ramipril 1 mg/kg/j) dans les biberons d'eau.
- 4. IEC + HOE-140 (n= 10)** : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours (Ramipril 1 mg/kg/j) et bloquées par l'HOE-140 (1 injection sous cutanée de 250 µg/kg) juste avant le début du choc.
- 5. HOE-140 (n= 10)** : souris choquées, bloquées par l'HOE-140 (1 injection sous cutanée de 250 µg/kg) juste avant le début du choc.

L'ensemble des groupes a été sacrifié 24 heures après le choc (J1).

2.1.2 . Description du choc hémorragique à objectif de volume

Première partie du travail :

L'anesthésie générale a été induite par injection intra-péritonéale de 0,01 ml/g du mélange Kétamine+Xylazine., soit des doses respectives de kétamine et de xylazine de 250mg/kg et 10mg/kg.

Un cathéter a été inséré dans la veine jugulaire interne gauche pour les perfusions et un autre dans l'artère fémorale gauche pour le monitoring de la pression artérielle et la réalisation de la déplétion sanguine. L'anesthésie a été maintenue jusqu'à la fin du choc avec de la kétamine intraveineuse (20 mg/kg/h). Les souris ont ensuite été intubées puis ventilées mécaniquement (fréquence respiratoire à 150/min et volume courant à 9 ml/kg à l'aide du respirateur Minivent 845 (Hugo Sachs Elektronik). La pression artérielle moyenne (PAM) a été monitorée en continu via le système d'acquisition IOX®(EMKA Technologie).

Le choc hémorragique a été réalisé par prélèvement de 0,6 ml (Première partie du travail) ou 0,3 ml (Seconde partie du travail) de sang artériel au niveau du cathéter artériel fémoral pendant une durée de 120 minutes. A la fin de cette période, le sang prélevé a été réinjecté par la voie veineuse centrale à un débit compris entre 2,5 et 3,5 ml/h. La réanimation a été poursuivie par la perfusion de cristalloïdes (Ringer lactate Viaflo, Baxter) d'un volume équivalent à celui du sang prélevé (Photo n°1). La surveillance hémodynamique a été poursuivie pendant toute la durée de la réanimation. L'artère fémorale et la veine jugulaire ont ensuite été ligaturées, les cathéters retirés et la peau suturée. Les souris ont été extubées dès les premiers signes de réveil et la reprise d'une ventilation spontanée efficace.

Seconde partie du travail :

L'un de nos objectifs était d'étudier l'évolution de la souffrance tissulaire dans le groupe IEC par rapport aux autres groupes, notamment au groupe IEC+HOE-140. Pour cela, il a été nécessaire de mettre au point des modalités expérimentales permettant de mettre en évidence une différence significative de pression artérielle dans le groupe IEC, sans pour

autant majorer la mortalité afin de conserver une capacité d'analyse post-choc. Les précédents travaux (12) de notre équipe ont montré qu'un seuil de pression à 35mmHg dans le groupe IEC limite le risque de mortalité contrairement à ce qui est observé avec des valeurs plus basses de pression artérielle (<30 mmHg).

De fait, dans ce modèle à objectif de volume, le volume nécessaire à prélever a été fixé à 0,3 ml de sang. Ce volume est de 50% moins élevé que celui prélevé dans notre précédent travail (12)(ainsi que dans la première partie de ce travail) chez des souris C57BL6 non traitées.



Photo n°1 : Modèle expérimental

1. Sonde d'intubation
2. Voie veineuse centrale jugulaire
3. Cathéter artériel fémoral
4. Sang prélevé et hépariné

2.2 . Sacrifice des animaux

Afin d'étudier l'impact tissulaire du choc hémorragique dans la seconde partie de notre travail, nous avons été amené à sacrifier les animaux à 24 heures du choc.

Les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intra-péritonéale de 0,01 ml/g du mélange Kétamine/Xylazine. Un cathéter (22 Gauge, Introcan Certo®, Laboratoire Braun) a été placé en intra-aortique pour une exsanguination. Le sang récupéré a été centrifugé (microcentrifuge® Fisherbrand 6000 rpm) afin d'obtenir le plasma. Les

organes ont été prélevés. L'un des reins, la moitié du foie (découpé par une incision au bistouri) et l'ensemble du tube digestif (jéjunum et colon distal) ont été fixés dans le formaldéhyde pour étude histologique. L'autre rein, la moitié du foie ainsi que la partie distale de l'intestin (Iléon) ont été congelés à -80° pour étude RTPCR.

2.3 . Paramètres étudiés (Seconde partie du travail)

2.3.1 . Etude de la fonction rénale et hépatique

Etude de la fonction rénale :

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) a été estimé à J1 par la mesure de la cystatine C plasmatique, un traceur librement filtré par le glomérule et totalement réabsorbé par le tubule (13,14) .Chez la souris, sa concentration plasmatique est plus prédictive du DFG que celle de la créatininémie classiquement utilisée jusqu'à présent (N. Mayeur, Abstract Société physiologie 2014). La Cystatinémie a été dosée sur un prélèvement sanguin réalisé lors du sacrifice à l'aide d'une trousse de dosage ELISA (Cystatin C (Mouse) ELISA, Enzo Life Sciences, ALX-850-328).

Etude de la fonction hépatique :

La fonction hépatique a été évaluée par le dosage des marqueurs ASAT, ALAT, Bilirubine et LDH dans le sérum (analyseur biochimique PENTRA 400®, HORIBA).

2.3.2 .Analyse en RTPCR quantitative

Extraction des ARNs totaux : les ARNs totaux ont été extraits sur colonne en utilisant le kit RNeasy plus Mini® (Qiagen Inc) selon les instructions du fabricant, puis élués dans de l'eau exempte de RNase. La pureté et la concentration en ARN extrait ont été évaluées par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop® (Labtech). Les ARNs ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Rétro-transcription : 300 ng d'ARNs extraits ont été rétro-transcrits en ADNc par l'utilisation d'amorces nucléotidiques aléatoires (Random hexamer®, Amersham) dans un milieu réactionnel contenant MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM,

desoxyriboNucleotides Tri-Phosphate 1 mM, RNasine 20U (inhibiteur de RNases, Promega), Superscript II Reverse Transcriptase® 200U (Invitrogen), pH 8,3. Les ADNc ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

PCR quantitative à haut débit :

L'amplification a été réalisée par PCR haut débit nanofluidique (Biomark) selon les indications du constructeur.

L'analyse a été effectuée avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La concentration initiale d'ADNc a été déduite du nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent atteigne le seuil de détection dans la phase exponentielle d'amplification (valeur Ct). Le paramètre ΔCt (Ct du gène étudié - Ct de la moyenne des gènes de référence : actine et GAPDH) a désigné la quantité relative de transcrits pour le gène étudié par rapport à la moyenne des gènes de référence, l'expression de ce dernier n'étant pas modifiée par le protocole. Le paramètre $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt choc - ΔCt sham) a représenté la différence d'expression du gène d'intérêt entre nos conditions expérimentales et celle de référence (souris sham). La valeur $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a reflété le degré d'induction par rapport à la référentielle.

Les marqueurs de souffrance tissulaire choisis ont été respectivement pour le foie : HGF (15), pour le rein : KIM1 (16) et pour l'intestin : ZO1 et IL22 (17-20) (Tableau n°1)

Gènes	Sens	Anti Sens
IL22	ATA CAT CGT CAA CCG CAC CTT T	AGC CGG ACA TCT GTG TTG TTA T
ZO1	CGC CAA ATG CGG TTG ATC	TTT ACA CCT TGC TTA GAG TCA GGG TTA
KIM1 v1	TGC TGC TAC TGC TCC TTG TG	TAG AGA CAC GGA AGG CAA CC
HGF	AGT CAG CAA AAA CGA CTC TTA CCA	CA AGT GAA TGT AAA GCC CCT GTT
B actin	CGC TGT ATT CCC CTC CAT CG	CA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T
GAPDH	GTG TTC CTA CCC CCA ATG TGT	TTG TCA TAC CAG GAA ATG AGC TT

Tableau n°1: Séquence des amorces utilisées en RtPCR

2.3.3 .Analyse histologique

Les organes, conservés dans une solution de formaldéhyde 4% puis alcoolique à 70°, ont été déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 4 microns ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome.

Les lames ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et au PAS pour le foie.

Elles ont ensuite été scannées (NanoZoomer 2.0-RS®) et les images ont été analysées à l'aide du logiciel NDP Hamamatsu®.

- Le « *kydney injury score* » nous a permis de caractériser l'atteinte rénale. Le nombre de lésions tubulaires (débris cellulaire, désépithélisation, vacuolisation et oedème cellulaire) a été rapporté au nombre de tubules visualisés sur la zone analysée. Ce nombre a été exprimé en pourcentage et coté comme suivant : 0 = Pas de lésions, 1 =< 10 %, 2 de 11 à 25 %, 3 = de 26 à 45 %, 4 = de 46 à 75 %, 5 = > 76 % (21).
- Le score de THOOLEN nous a permis de caractériser la souffrance hépatique grâce à la cotation de la gravité des lésions au niveau des sinusoides veineux et de leur étendue dans le foie (22).
- Le score de CHIU nous a permis de grader les lésions intestinales en se focalisant sur la partie distale des villosités (23).

2.3.4 .Analyse statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne \pm écart-type. Les différences statistiques entre les groupes sont testées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 4.02) par analyse de variance (One-Way ANOVA, test non paramétrique de Kruskal-Wallis). Lorsque l'essai de Kruskal-Wallis était significatif, le test de Dunns a permis de faire l'analyse des différences entre deux groupes. Les résultats ont été considérés comme significativement différents lorsque $P < 0,05$.

3 . RESULTATS

3.1 . Première partie du travail : MORTALITE

Nous avons appliqué un choc hémorragique par prélèvement de 0,6 ml de sang pendant 120 minutes chez 16 souris. La surveillance des pressions artérielles durant le choc à montré une pression significativement inférieure au sein du groupe IEC en comparaison au groupe contrôle et IEC+HOE-140 durant la phase de choc et la période de réanimation. Aucune différence de pression artérielle n'a été constatée entre les différents groupes pendant la phase initiale. Dans le groupe de souris prétraité par IEC (n=6) 5 souris sont décédées dont 4 au cours du choc hémorragique et 1 souris 152 minutes après la fin de la réanimation. Dans le groupe IEC+HOE-140 (n=5), 1 souris est décédée suite à l'application du choc durant la période de réanimation, soit une différence significative de mortalité entre les 2 groupes avec $p = 0,033$. (Figure n°1)

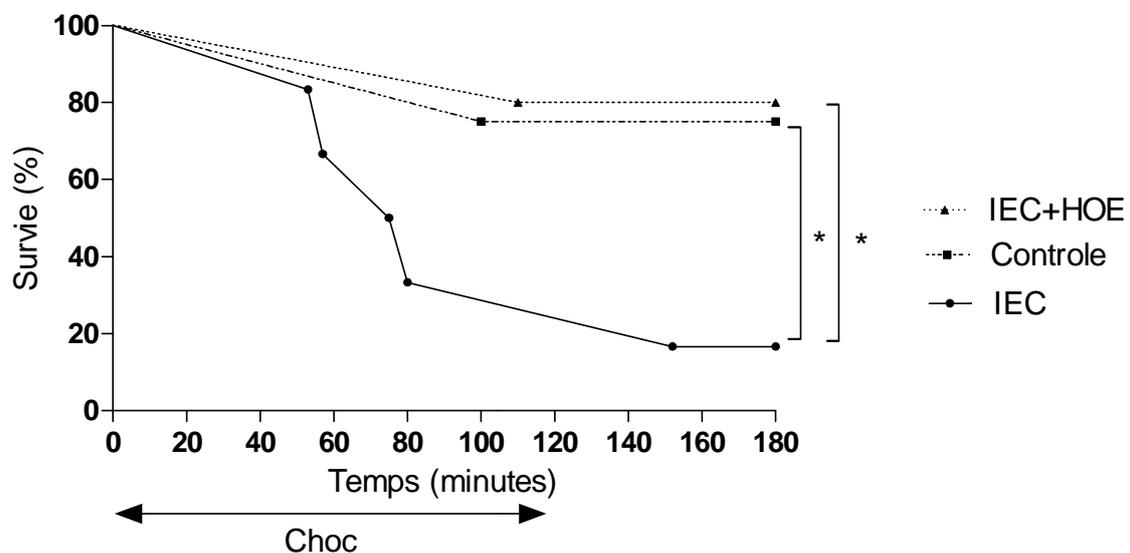


Figure n° 1 : Courbes de survie lors d'un choc hémorragique murin sévère avec prélèvement de 0,6 ml de sang.

(Contrôle : souris anesthésiées et choquées, IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours, IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc)

* : $p < 0,05$

3.2 . Seconde partie du travail : IMPACT TISSULAIRE

3.2.1 . Caractéristiques des groupes

Au total, 50 animaux ont été inclus dans le protocole. La mortalité liée au choc a été nulle dans tous les groupes.

La Pression artérielle moyenne (PAM) à la phase initiale de l'anesthésie était significativement plus élevée dans le groupe HOE-140 par rapport au groupe IEC ($p < 0,05$). Il n'y a pas eu de différence entre les autres groupes à la phase initiale de l'anesthésie.

Le groupe IEC a présenté une PAM significativement inférieure à celle des autres groupes durant les différents temps opératoires. (Figure n° 2)

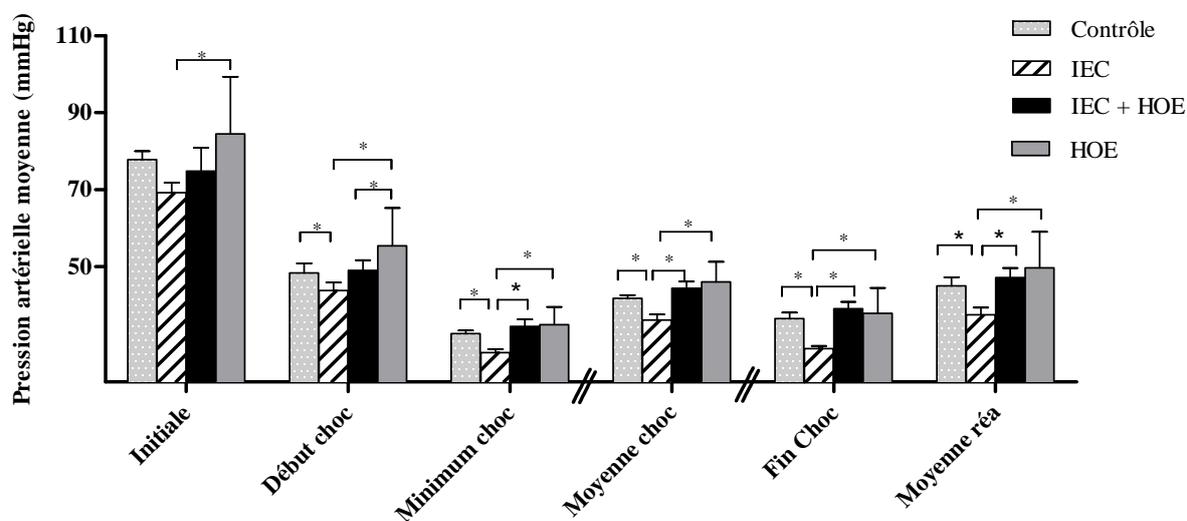


Figure n° 2 : Pressions artérielles moyennes (MmHg) durant un choc hémorragique modéré murin après prélèvement de 0,3 ml de sang.

(Contrôle : souris anesthésiées et choquées ; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours ; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc ; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE - 140 juste avant le début du choc)

* = $p < 0,05$

3.2.2 . Conséquences fonctionnelles

3.2.2.1 . Au niveau rénal

L'évaluation de la fonction rénale par mesure de la cystatinémie à J1 (Figure n° 3A) a mis en évidence une augmentation significative de la cystatinémie dans le groupe IEC corrigée par l'HOE-140.

L'atteinte tubulaire mesurée par la quantification de KIM1 en RTPCR (Figure n° 3B) met en évidence une surexpression dans le groupe IEC comparativement aux groupes contrôle, IEC+HOE-140 et HOE-140.

Après coloration à l'hématoxyline éosine, l'analyse morphologique rénale par le score AKI n'a pas montré de différence entre les groupes de souffrance ischémique à la jonction corticomédullaire quel que soit le groupe étudié (24).

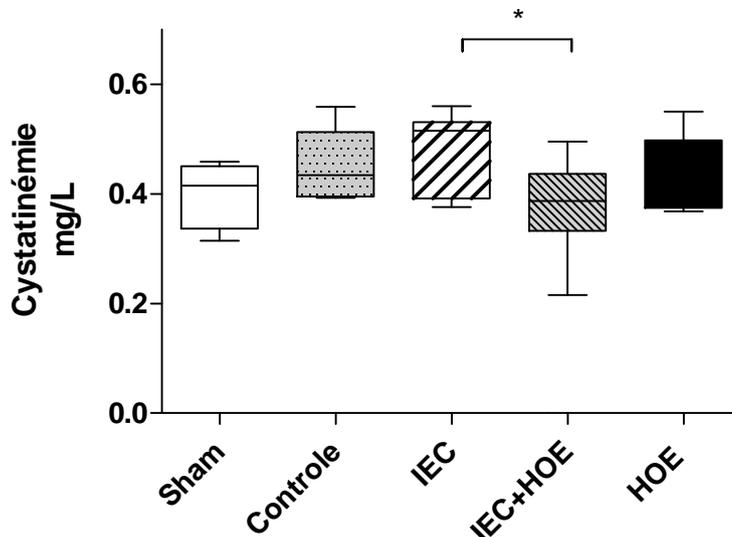


Figure n° 3A : Evaluation de la fonction rénale par mesure de la Cystatinémie à J1 par ELISA (Sham : souris anesthésiées non choquées ; Contrôle : souris anesthésiées et choquées ; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours ; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc ; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE -140 juste avant le début du choc)

* = $p < 0.05$

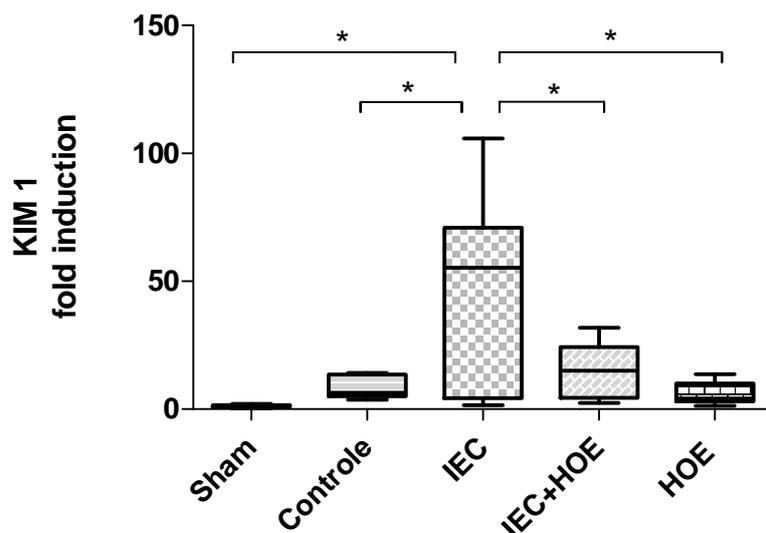


Figure n° 3B : Atteinte tubulaire mesurée par la quantification de Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) en RtPCR à J1

(Sham : souris anesthésiées non choquées; Contrôle : souris anesthésiées et choquées; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE -140 juste avant le début du choc)

* = $p < 0,05$

3.2.2.2 . Au niveau hépatique

L'évaluation de la fonction hépatique par analyse biochimique du sérum (Figure n° 4A) a mis en évidence une cytolyse responsable d'une majoration des ALAT dans le groupe IEC par rapport aux autres groupes ($p < 0,05$). Nous n'avons pas retrouvé de différence significative concernant les ASAT et les LDH. L'analyse de la cholestase, du fait d'interférences pour le dosage de la bilirubine, n'a pas pu être interprétée (résultats en dehors des limites de normalité).

L'étude par RTPCR de l'expression de HGF dans le foie a montré une surexpression de ce gène dans le groupe IEC (Figure n° 4B).

Après coloration à l'hématoxyline éosine et au PAS (acide periodique de Schiff), l'étude morphologique hépatique par le score de THOOLEN n'a pas révélé de signes précoces de souffrance ischémique au niveau des sinus veineux.

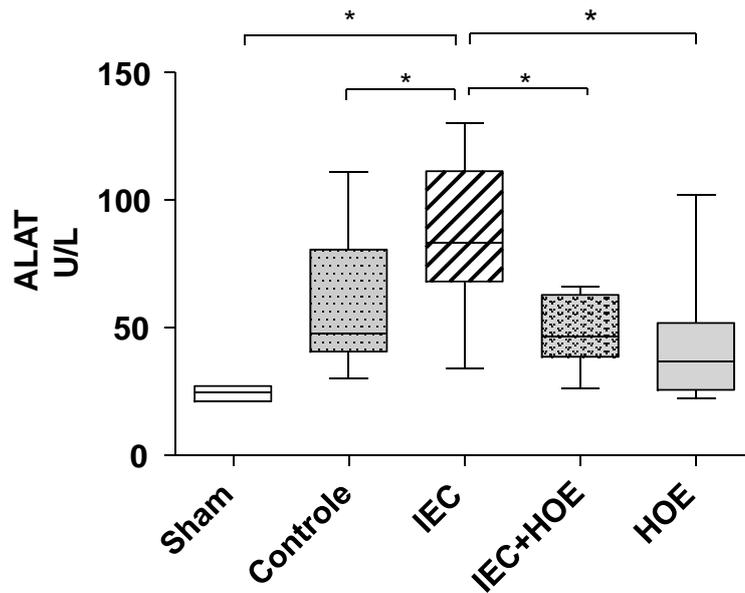


Figure n° 4A : Evaluation de la fonction hépatique par mesure des Alanine AminoTransférase (ALAT) en biochimie dans le sérum à J1. (Sham : souris anesthésiées non choquées; Contrôle : souris anesthésiées et choquées ; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours ; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc ; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE -140 juste avant le début du choc)

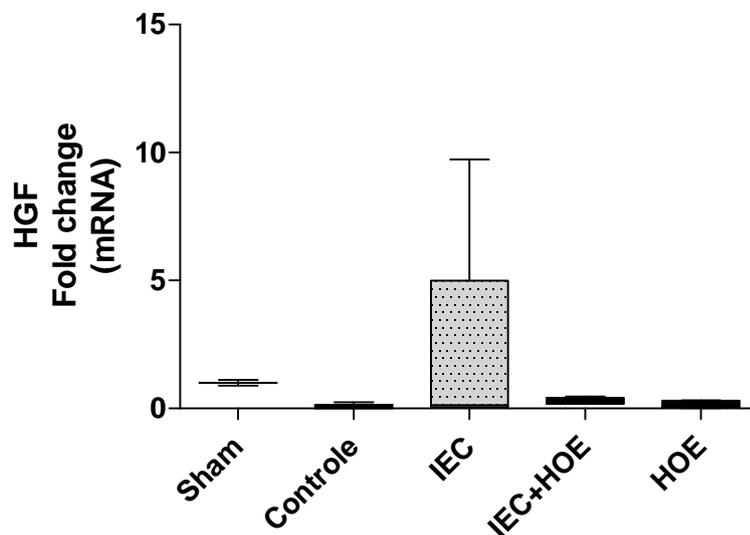


Figure n° 4B : Etude par RtPCR de l'expression de Hépatocyte Growth Factor (HGF) dans le foie à J1. (Sham : souris Anesthésiées non choquées ; Contrôle : souris anesthésiées et choquées ; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours ; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc ; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE -140 juste avant le début du choc)

3.2.2.3 .Au niveau intestinal

L'évaluation de la fonction intestinale par RTPCR n'a pas détecté d'amplification de IL22 au sein du tissu intestinal.

Nous avons observé une tendance à la surexpression de ZO1 dans le groupe IEC qui semblait être prévenue dans le groupe IEC + HOE-140 (Figure n° 5A).

L'analyse morphologique intestinale par l'utilisation du score de CHIU avec une évaluation centrée sur le sommet des villosités n'a pas révélé de souffrance précoce du parenchyme digestif.

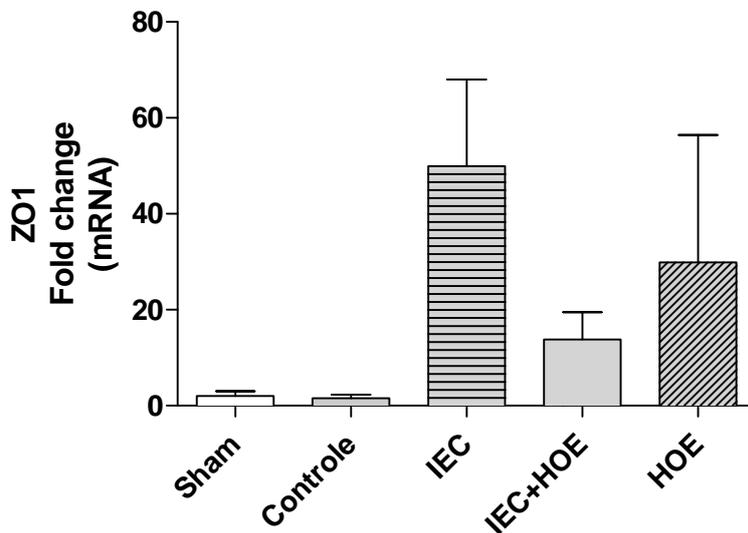


Figure n° 5A: Evaluation de la perméabilité intestinale par quantification de Zonula

Occludens 1 (ZO1) en RtPCR dans l'intestin à J1

(Sham : souris Anesthésiées non choquées ; Contrôle : souris anesthésiées et choquées ; IEC : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours ; IEC+HOE-140 : souris choquées, préalablement traitées par IEC pendant 7 jours et bloquées par l'HOE-140 juste avant le début du choc ; HOE-140 : souris choquées, bloquées par l'HOE -140 juste avant le début du choc)

4 . DISCUSSION

Les résultats obtenus dans la partie initiale de notre étude mettent pour la première fois en évidence dans un modèle de choc une augmentation significative de mortalité chez des souris traitées préalablement par IEC. Aucune étude chez l'animale n'a, à notre connaissance, été réalisée jusqu'à présent sur le sujet. Il est cependant intéressant de noter qu'un petit nombre d'études cliniques humaines observationnelles rétrospectives vont dans le sens d'un effet délétère des IEC en situation critique (25,26).

Nous montrons également pour la première fois que cette surmortalité est corrigée par le blocage aigu du RB2 juste avant la réalisation du choc. Un intérêt de l'antagonisation du RB2 même en l'absence de traitement préalable par IEC a été décrit dans des modèles de choc septique (27), hémorragique (28) ou de SIRS.

Nous avons récemment montré qu'un traitement préalable par IEC aggravait l'hypotension et l'hyperlactatémie dans un modèle murin de choc hémorragique modéré. Cet effet était corrigé par une injection préalable d'HOE-140 (12). Dans la première partie de notre travail, la mortalité dans les groupes contrôle et IEC+HOE-140 ainsi que la pression artérielle observée durant le choc (PA moyenne = 35 mmHg) sont identiques à celles retrouvées par N.Mayeur dans un précédent travail (29).

Ces deux observations soulignent le caractère robuste de la forte surmortalité du groupe IEC et l'efficacité de l'antagonisation. La profondeur de notre modèle de choc, bien que sévère, ne paraît donc pas être un biais de sélection dans l'analyse de la mortalité importante du groupe IEC.

Concernant la seconde partie de notre étude, les résultats hémodynamiques dans les différents groupes sont superposables à ceux des études antérieures (29) (12). En effet, après prélèvement de 0,3 ml de sang, le groupe IEC présente une PAM significativement plus basse que celles des autres groupes. Cet effet est prévenu par l'injection d'HOE-140 au moment du choc.

Cependant, les PAM observées dans notre étude sont significativement plus importantes que celles des travaux antérieurs et ce quelque soit le groupe. Cette moindre sévérité détermine la principale limite de notre étude : le volume prélevé a induit un état de choc modéré chez la souris traitée par IEC et une fluctuation plus modeste dans les autres groupes.

L'élévation de l'HGF (par RTPCR) dans le groupe IEC, corrigée par l'injection d'HOE-140, est néanmoins un argument en faveur d'une agression hépatique (15).

Au niveau moléculaire, les résultats biochimiques ont révélé une augmentation des ALAT. L'ALAT est la transaminase la plus sensible et la plus spécifique du foie. L'augmentation des aminotransférases dans le sérum témoigne, soit de la destruction des tissus qui en contiennent, soit d'une modification de la perméabilité membranaire hépatocytaire. Une souffrance tissulaire microscopiquement visible, à type de nécrose des cellules hépatiques, n'est donc pas indispensable pour observer l'augmentation des transaminases (30). Helling et coll (31) ont décrit la cinétique d'apparition des dommages hépatiques après un choc de type ischémie-reperfusion. Ils ont observé une augmentation initiale rapide des transaminases suivie, après un délai de 5 jours, par l'apparition d'une cholestase et de lésions microscopiquement visibles. Ce délai de 5 jours peut expliquer l'absence de cholestase et de lésions anatomiques dans notre travail puisque le sacrifice a été effectué à J1.

Les résultats obtenus sur le foie sont corroborés par les données recueillies sur le rein, avec une absence d'atteinte de la structure morphologique rénale au niveau de la jonction cortico-médullaire. Le dosage de la cystatinémie C a montré une diminution de la fonction rénale dans l'ensemble des groupes choqués. Le groupe IEC+HOE-140 semble davantage préservé. De plus, l'analyse de KIM1 en RTPCR a mis en évidence l'atteinte moléculaire infra-clinique rénale, avec une surexpression significative de cette molécule dans le groupe IEC par rapport aux autres groupes d'intérêts.

KIM-1 est un bio-marqueur validé de l'agression rénale aigue. De nombreux travaux ont montré son intérêt dans différents modèles d'agression rénale (32,33).

Enfin, l'analyse de l'impact intestinal a confirmé l'absence de souffrance ischémique tissulaire en microscopie au niveau du sommet des villosités intestinales de l'iléon (zone la plus sensible à l'ischémie). En dépit de l'absence de dommage histologique patent, nous avons identifié une tendance à la surexpression de ZO1 en RTPCR en faveur d'une majoration de la perméabilité intestinale lors du choc hémorragique, phénomène qui est plus marqué dans le groupe IEC. Cet effet est réduit chez les animaux recevant aussi de l'HOE-140. La protéine ZO1, essentielle au maintien des jonctions serrées intestinales, est surexprimée en situation d'agression ce qui permet le maintien de la barrière

digestive et limite la fuite de liquide vers l'interstitium (34). Cette augmentation de perméabilité est à l'origine d'une translocation bactérienne associée à une activation du système lymphoïde local puis généralisé avec SIRS et syndrome de défaillance multi organique (MODS) (35) (36)

L'absence de lésions histologique dans l'ensemble des organes étudiés semble d'origine multifactorielle. En effet, nous avons pris le parti d'effectuer un choc d'intensité modérée (PAM plus haute que dans les études précédentes) nécessaire à la survie et à l'analyse des souris IEC. Cette observation suggère que la procédure mise en œuvre représentait une agression tissulaire insuffisante. D'autre part, la littérature souligne que le délai nécessaire d'installation des lésions au niveau cellulaire est de l'ordre de 3 à 5 jours. Pour cette raison, l'absence de différences entre les groupes concernant les résultats anatomopathologiques peut également résulter du choix d'un sacrifice précoce des souris associé à une intensité de choc insuffisante.

5 . CONCLUSION

L'obtention d'une surmortalité lors d'un choc hémorragique dans le groupe IEC corrigée par l'antagonisation précoce du RB2 est un argument robuste permettant de confirmer l'hypothèse d'un effet protecteur de l'HOE-140 lors d'un choc hémorragique chez des souris traitées par IEC.

Les résultats obtenus dans la seconde partie de notre étude sont en faveur d'une atteinte rénale et hépato-splanchnique plus importante chez les souris préalablement traitées par IEC lors d'un choc hémorragique. Cette majoration de l'atteinte est prévenue par le blocage spécifique des récepteurs B2 de la bradykinine (HOE-140).

Ces résultats confirment nos travaux antérieurs (12) et soulignent l'intérêt hémodynamique du blocage précoce du RB2 par l'HOE-140 en cas de choc hémorragique chez les souris traitées par IEC.

En cas de confirmation de ces résultats, l'HOE-140 pourrait être d'un intérêt crucial dans la prévention des hypotensions en réanimation et lors de procédure de chirurgie en urgence chez les patients traités au long cours par IEC.

Vu
Accord pour l'impression

Dr GEERAERTS



Pr GEERAERTS Thomas
Anesthésiste Réanimateur - N° RPPS : 1000 156 52 99
Unité d'Anesthésie et de Réanimation Neurochirurgicale
Hôpital Pierre Paul Riquet - Place du Dr Baylac
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 61 77 21 00 - Fax 05 61 77 21 70

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Toulouse - Purpan



Didier CARRIÉ

6 . PERSPECTIVE : Etude AIEC

Le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire est un des objectifs importants de la prise en charge anesthésique dans la période péri-opératoire. Les facteurs pouvant altérer cette homéostasie sont nombreux : antécédents du patient (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, dysautonomie, traitement personnel (IEC, bêta bloquant), technique d'anesthésie (ventilation artificielle, médicaments anesthésiques) et geste chirurgical lui-même (hémorragie, clampage vasculaire).

Le rôle majeur de la pression artérielle (PA) dans la perfusion des organes, notamment celle des organes les plus sensibles à l'hypoperfusion (cerveau, coeur, tube digestif et reins) expose à un risque de défaillance organique en cas de baisse de la PA au cours d'une anesthésie (1).

Chez les patients traités par IEC ou ARA2 au long cours, plusieurs études rapportent des hypotensions artérielles peropératoires plus sévères si le traitement par inhibiteurs du SRAA est maintenu jusqu'au jour de l'intervention (25,37). Elles sont favorisées par un état hypovolémique préopératoire, par l'existence d'une dysfonction diastolique et par l'association des inhibiteurs du SRAA à d'autres thérapeutiques hypotensives. Ces épisodes sont le plus souvent corrigés par un remplissage et par l'utilisation de sympathomimétiques. Toutefois, au cours de l'anesthésie, la diminution de l'activité du système sympathique est compensée par la mise en jeu du système vasopressinergique et du SRAA afin de maintenir la PA. Chez le patient traité de façon chronique par les IEC ou ARA2, le système vasopressinergique ne peut à lui seul corriger la baisse du retour veineux. Cette interférence explique l'augmentation de la fréquence des hypotensions artérielles observées au cours de l'anesthésie, ainsi que les cas d'hypotensions réfractaires décrits (38).

Il faut également souligner que la poursuite du traitement par IEC prive le rein d'un mécanisme homéostatique essentiel face à une baisse de pression artérielle. Ainsi, en cas de blocage du système rénine angiotensine, toute baisse de la pression artérielle expose à une dégradation postopératoire de la fonction rénale.

Les Recommandations Formalisées d'Experts recommandent d'interrompre les inhibiteurs du SRAA au moins 12 heures avant une intervention lorsque ceux-ci constituent un traitement de fond de l'hypertension artérielle (accord fort) (39,40) Chez

le patient souffrant d'insuffisance cardiaque, le traitement chronique par les IEC et ARA2 peut influencer le profil hémodynamique de l'induction anesthésique.

Toutefois, l'arrêt du traitement peut engendrer un déséquilibre de la cardiopathie. Il est recommandé dans ce cas, de maintenir les inhibiteurs du SRAA lorsque ceux-ci sont prescrits dans le cadre d'une insuffisance cardiaque. Le risque d'hypotension au cours d'une chirurgie majeure doit alors être pris en compte (accord fort) (39,40). Ces recommandations d'experts reposent sur des études observationnelles avec un faible niveau de preuve. Les connaissances physiopathologiques sur l'activation du SRAA et du SKK n'ont jamais été décrites au cours d'une anesthésie. Les mécanismes conduisant à l'hypotension périopératoire chez ses patients traités par antagonistes du SRAA sont donc très mal connus.

Au sein de l'hôpital de Rangueil, l'analyse épidémiologique des patients de chirurgie cardiaque nous a permis de constater qu'environ 15% des patients opérés sont traités par des IEC ou ARA2 dans le cadre d'une insuffisance cardiaque chronique. La stratégie actuelle de la prise en charge de ces patients est d'interrompre systématiquement les inhibiteurs du SRAA 24h avant la chirurgie malgré ce que préconisent les Recommandations Formalisées d'Experts (RFE).

L'objectif principal de ce travail est l'amélioration des pratiques professionnelles par l'appropriation locale d'un référentiel (39,40) en comparant la fréquence de survenue d'une insuffisance rénale lors de l'application des nouvelles recommandations par rapport aux pratiques anciennes.

Les objectifs secondaires sont :

- l'évaluation des conséquences de la modification de ces pratiques sur l'incidence des épisodes hypotensifs per-opératoire.
- l'évaluation des conséquences de la modification de ces pratiques sur l'équilibre de l'insuffisance cardiaque.

Il s'agit d'une étude prospective, observationnelle, uni-centrique au CHU de Toulouse dans le cadre d'une évaluation des pratiques professionnelles sur une durée de 2 ans.

Un effectif de 180 malades a été calculé pour un risque Alpha de 5%, une puissance de 80% et une variation de l'événement insuffisance rénale aiguë de 50% entre les deux groupes pour une fréquence d'insuffisance rénale constatée postopératoire de 30%.

Les patients inclus seront ceux traités par IEC ou ARA2 au long cours dans le cadre d'une insuffisance cardiaque chronique par dysfonction systolique devant subir une chirurgie cardiaque.

L'insuffisance cardiaque chronique systolique est définie par une FEVG < 50% (41,42)

Nous excluons de notre étude les patients opérés en urgence

Le critère de jugement principal sera la survenue d'une insuffisance rénale aiguë en post opératoire de chirurgie cardiaque évaluée par l'utilisation des critères KDIGO (diurèse et créatininémie) et par le dosage de la cystatinémie/cystatinurie, marqueur précoce de dysfonction rénale. (Annexe 1)

Les critères de jugement secondaires seront :

- la survenue d'une hypotension artérielle après induction anesthésique.
- le déséquilibre de l'insuffisance cardiaque par une évaluation au 5ème jour postopératoire
- la survenue d'un trouble du rythme supra ventriculaire

Dans un premier temps, après vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion, la première partie des patients inclus bénéficiera de l'arrêt des inhibiteurs du SRAA en préopératoire correspondant à notre pratique actuelle. Dans un second temps, les patients nouvellement inclus se verront maintenir les IEC ou ARA2 en préopératoire tel que cela est actuellement recommandé par les dernières RFE sur la gestion des traitements chroniques préopératoires. Un document d'information leur sera remis.

Les données cliniques seront issues des données couramment recueillies dans le service. Les antécédents seront issus de la feuille de consultation d'anesthésie. Les données per et postopératoires seront recueillies en exploitant les données issues de la feuille de surveillance postopératoire.

Après une étape d'analyse statistique descriptive, les deux groupes seront comparés. Nous analyserons la distribution de notre population. Les valeurs qualitatives seront discriminées entre les deux groupes par des tests de Chi2 ou de Fisher. Pour les valeurs quantitatives, nous analyserons les différences entre les groupes par des t test ou des analyses non paramétriques de type Mann Whitney.

Les données biologiques ont été recueillies sur les données des bilans biologiques standards réalisés en réanimation.

L'évaluation de la fonction rénale par les critères RIFLE sera réalisée par le monitoring de la créatininémie préopératoire et sa valeur maximale jusqu'à J5 postopératoire ainsi que de la diurèse post-opératoire. Le recours à une épuration extra rénale sera recherché. Nous effectuerons d'autre part un dosage de la cystatinémie et cystatinurie en pré et postopératoire comme marqueur précoce de souffrance rénale (réalisé sur des reliquats de prélèvements d'urines et de sang)

Les facteurs confondants pouvant péjorer la fonction rénale tels que l'usage de néphrotoxique, la durée de la circulation extra-corporelle, le volume de saignement et le recours à la transfusion seront identifiés.

L'évaluation hémodynamique sera réalisée par le relevé tensionnel à l'entrée au bloc et 10 minutes après l'induction. Une évaluation de la fonction cardiaque sera effectuée lors du bilan standard préopératoire et une nouvelle échographie trans-thoracique sera pratiquée au bloc 10 minutes après l'induction afin de monitorer l'évolution des profils de remplissage et de la fonction myocardique. L'usage de catécholamine, leur posologie et la durée d'administration per et postopératoire seront relevés. L'implication de toute autre thérapeutique à visée hémodynamique sera relevée.

L'évolution de la fonction cardiaque sera suivie par le monitoring des BNP, échographie cardiaque et examen clinique (recherche de signes d'insuffisance cardiaque et poids) en préopératoire et à J5 postopératoire.

Nous suivrons l'apparition d'un éventuel trouble du rythme supra ventriculaire.

	J-1	J0	J1	J2	J3	J4	J5
Créatininémie	√	√	√	√	√	√	√
Diurèse des 24h		√	√	√	√	√	√
Cystatinémie /Cystatinurie			√				√
Examen clinique (insuffisance cardiaque/Poids)	√						√
Echographie Transthoracique	√	√					√
BNP	√						√
Tension artérielle / Fréquence Cardiaque	√	√					
Surveillance des troubles du rythme supraventriculaire		√	√	√	√	√	√
Posologie des catécholamines		√	√	√	√	√	√

Ce travail a reçu l'accord du CER de la SFAR n° IRB 00010254-2015-029 en date du 26-02-2016 et a débuté dans le service.

BIBLIOGRAPHIE

1. Collège de la Haute Autorité de santé. HAS. Evaluation des médicaments antihypertenseur et place dans la stratégie thérapeutique. 2010.
2. Shah M, Jain AK, Brunelli SM, Coca SG, Devereaux PJ, James MT, et al. Association between angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use prior to major elective surgery and the risk of acute dialysis. *BMC Nephrol*. 2014;15:53.
3. Coca SG, Garg AX, Swaminathan M, Garwood S, Hong K, Thiessen-Philbrook H, et al. Preoperative angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blocker use and acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2013 Nov;28(11):2787–99.
4. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Nov;16(11):3365–70.
5. Barakat N, Hussein A-AM, Abdel-Maboud M, El-Shair MA, Mostafa A, Abol-Enein H. Ischaemia-reperfusion injury in renal transplantation: the role of nitric oxide in an experimental rat model. *BJU Int*. 2010 Oct;106(8):1230–6.
6. Bouaziz H, Joulin Y, Safar M, Benetos A. Effects of bradykinin B2 receptor antagonism on the hypotensive effects of ACE inhibition. *Br J Pharmacol*. 1994 Nov;113(3):717–22.
7. McNeill JR, Stark RD, Greenway CV. Intestinal vasoconstriction after hemorrhage: roles of vasopressin and angiotensin. *Am J Physiol*. 1970 Nov;219(5):1342–7.
8. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993 Dec 22;270(24):2957–63.
9. Barrantes F, Tian J, Vazquez R, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA. Acute kidney injury criteria predict outcomes of critically ill patients. *Crit Care Med*. 2008 May;36(5):1397–403.
10. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005 Aug 17;294(7):813–8.
11. Vieira JM, Castro I, Curvello-Neto A, Demarzo S, Caruso P, Pastore L, et al. Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2007 Jan;35(1):184–91.
12. Charbonneau H, Buléon M, Minville V, Faguer S, Girolami J-P, Bascands J-L, et al. Acute Bradykinin Receptor Blockade During Hemorrhagic Shock in Mice Prevents the

Worsening Hypotensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Crit Care Med*. 2016 Mar 17;

13. Coll E, Botey A, Alvarez L, Poch E, Quintó L, Saurina A, et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2000 Jul;36(1):29–34.
14. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):1115–22.
15. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26 Suppl 1:188–202.
16. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002 Jul;62(1):237–44.
17. Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, Okanou T, Takamatsu T. Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum. *Acta Histochem Cytochem*. 2006 Apr 22;39(2):35–45.
18. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):237–48, 248.e1.
19. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res*. 2006 Nov;16(11):902–7.
20. Rendon JL, Li X, Akhtar S, Choudhry MA. Interleukin-22 modulates gut epithelial and immune barrier functions following acute alcohol exposure and burn injury. *Shock Augusta Ga*. 2013 Jan;39(1):11–8.
21. Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, Lucia MS, Ljubanovic D, Edelstein CL. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(8):1083–91.
22. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol*. 2010 Dec;38(7 Suppl):5S – 81S.
23. Quaedackers JS, Beuk RJ, Bennet L, Charlton A, oude Egbrink MG, Gunn AJ, et al. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplant Proc*. 2000 Sep;32(6):1307–10.
24. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Jul;9(4):427–34.
25. Auron M, Harte B, Kumar A, Michota F. Renin-angiotensin system antagonists in the

perioperative setting: clinical consequences and recommendations for practice. *Postgrad Med J*. 2011 Jul;87(1029):472–81.

26. Miceli A, Capoun R, Fino C, Narayan P, Bryan AJ, Angelini GD, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on clinical outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 3;54(19):1778–84.
27. Fein AM, Bernard GR, Criner GJ, Fletcher EC, Good JT, Knaus WA, et al. Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. *JAMA*. 1997 Feb 12;277(6):482–7.
28. Christopher TA, Ma XL, Gauthier TW, Lefer AM. Beneficial actions of CP-0127, a novel bradykinin receptor antagonist, in murine traumatic shock. *Am J Physiol*. 1994 Mar;266(3 Pt 2):H867–73.
29. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, et al. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2131–8.
30. Pariente. Augmentation des transaminases chez l'adulte. *Hepato-gstro et oncologie digestive*. 2013.
31. Helling TS. The liver and hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg*. 2005 Nov;201(5):774–83.
32. Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS, Wang Y, Clement MB, Ramirez V, et al. A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int*. 2009 Jul;76(1):108–14.
33. Ichimura T, Asseldonk EJPV, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1657–68.
34. Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 1):G467–75.
35. Weber GF, Schlautkötter S, Kaiser-Moore S, Altmayr F, Holzmann B, Weighardt H. Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1690–7.
36. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 2003 Apr;9(2):143–51.
37. Coriat P, Richer C, Douraki T, Gomez C, Hendricks K, Giudicelli JF, et al. Influence of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on anesthetic induction. *Anesthesiology*. 1994 Aug;81(2):299–307.
38. Srivastava K, Sacher VY, Nelson CT, Lew JI. Multifactorial Model and Treatment Approaches of Refractory Hypotension in a Patient Who Took an ACE Inhibitor the Day of Surgery. *Case Rep Anesthesiol*. 2013;2013:723815.

39. Société française d'anesthésie et de réanimation. [Perioperative management of chronic treatment and medical devices: cardiovascular pathologies]. *Ann Fr Anesthésie Rèanimation*. 2009 Dec;28(12):1046–56.
40. ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management. 2014.
41. Haute Autorité de Santé / Service des maladies chroniques et des dispositifs d'accompagnement des malades/ Guide du parcours de soin de l'insuffisant cardiaque. 2014.
42. ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure.

Article en Cours de relecture pour soumission à l'AJRCCM

Introduction :

In recent years, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (ACEi) have become the drugs of choice for the treatment of hypertension, heart and renal failure, coronary artery diseases, myocardial infarction and diabetes. By suppressing angiotensin and potentiating bradykinin effects through B2 receptor (B2R) activation, ACEIs activate hemodynamic, metabolic and cellular mechanisms that not only reduce high blood pressure, but also protect the endothelium, the heart, and the kidney, namely the target organs which are at risk in cardiovascular diseases (ref). However, it has been also shown, that ACEi induce severe or refractory hypotension during anaesthesia and are associated with increased renal failure and mortality (2,3). In fact, refractory hypotension or shock induces multi-organ dysfunction syndrome and death, and the number of organ failure is consequently a crucial prognosis marker (1).

It is currently recommended to stop ACEi before anesthesia (ref guideline européennes et américaines), but in case of emergency, ACEi cannot be stop. To our knowledge, no specific treatment exists to block deleterious hypotensive effects of ACEi during anaesthesia or shock.

Icatibant (HOE-140) is a high and specific B2R antagonist. Numerous animal and human studies showed that B2R antagonist attenuates the hypotensive effect of ACEi in different models of hypertension, (5). However, effect of B2R blockade in acute condition was never studied.

The objective of our experimental work was to study the impact of acute BR2 blockage on mortality and multi-organ failure in two different volume targeted haemorrhagic shock (VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK) in ACEi-treated mice (6).

Material and Méthods :

Animals. The animal experiments were performed according to the national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by the local board. The animals used in this study were 18- to 24-wk-old C57/BL6 wild-type mice (Harlan, Gannat, France).

Protocols design. Based on our previous work (6), two types of VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK were performed. Briefly, the animals were anesthetized with

ketamine and xylazine (125 mg/kg and 10 mg/kg, respectively), and intubated using an intratracheal cannula. Mechanical ventilation (9 mL/kg, 150/min) was carried out, without any ventilator settings modification during the procedure, with a specific ventilator Minivent 845 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The left jugular vein and femoral artery were catheterized, and ketamine (20 mg/kg/h) was continuously infused until the end of the shock procedure. Throughout the procedure, femoral arterial blood pressure was monitored using a blood pressure analyser (IOX, EMKA Technologie, France).

Two VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK were used. The only difference between the two protocols was the collected blood volume: in protocol 1, 0.6 ml of blood was withdrawn through the femoral arterial line for a severe VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK, and in protocol 2, 0.3 ml of blood was withdrawn for a moderate VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK. The first protocol was to determine mortality and the second protocol was to study hepatic and renal failure. In both protocols, the blood was stored in a 0.10 mL heparinized serum, and was reinfused at the end of the 2-hour period of shock with the addition of a lactated Ringer's solution (the volume of the initial blood withdrawn) to ensure appropriate fluid volume restoration. Mice were sacrificed at 24 hours after both VOLUME-TARGETED HEMORRHAGIC SHOCK protocols.

The mice were randomly assigned in three groups for the 2 protocols: 1/ACEI: shocked-mice treated with ACEI (n=6 and 11 for protocol 1 and 2); 2/ ACEI+HOE: shocked-mice treated with ACEI and a single bolus of HOE-140 (n=5 and 10 for protocol 1 and 2); 3/ Control: shocked-mice without treatment (n=5 and 9 for protocol 1 and 2). ACEi (ramipril, Sigma, Germany) was given at a dose of 1 mg/kg per day in drinking water (at a concentration of 5 µg/ml) during the 7 days prior to shock. Icatibant (Sigma, Germany) was subcutaneously administered at a dose of 250 µg/kg immediately before anaesthesia.

Mortality. We studied mortality for the first 180 minutes before end of the shock.

Renal exploration. The analysis of the renal function was carried out by the dosage of plasma Cystatin C by ELISA (Cystatin C (Mouse) ELISA Enzo Life Sciences, ALX-850-328) and from kidney injury molecule 1 (KIM1) on the kidney in RtPCR (5'-TGC TGC TAC TGC TTG TCC TG-3 'and 5'-TAG AGA GGA CAC AGG CAA CC-3'). Briefly, the RtPCR technique consisted (6) in an extraction of RNA by RNeasy Mini Kit® (Qiagen Inc.). RNA purity and concentration were assessed by spectrophotometry Nanodrop (Labtech). Finally, reverse transcription of 300 ng of RNA was performed into cDNA by using random oligonucleotide

primers (random hexamer, Amersham). Amplification was performed by high-speed nanofluidic PCR (Biomark) with analysis by method $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The value $2^{-\Delta\Delta C_t}$ reflected the degree of induction compared to the control condition.

Hepatic exploration. Hepatic impairment was assessed by the quantification of the Alanine aminotransferase (ATL) in plasma.

Statistical analysis. . Data are presented as the means \pm SEM. Comparisons between groups were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by the post hoc Dunn's test. The results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Results:

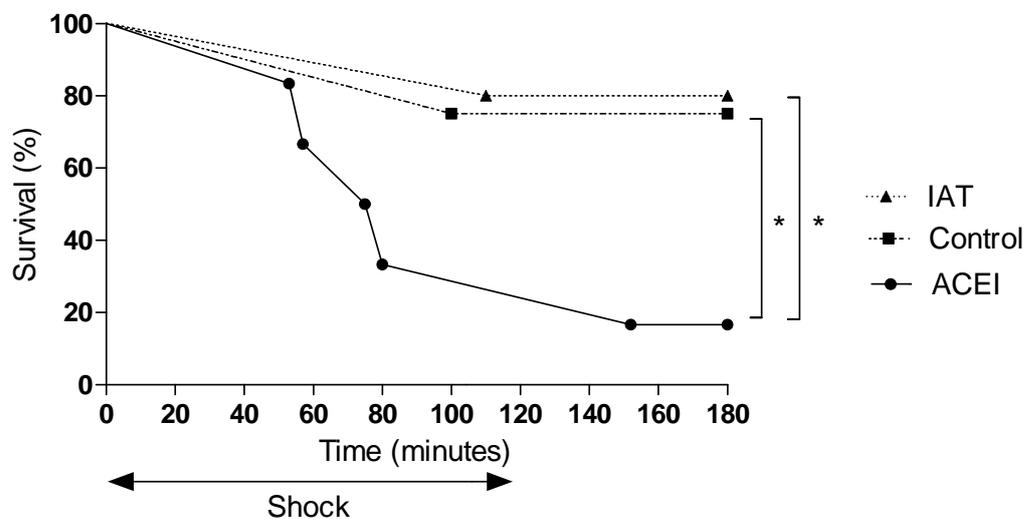


Figure 1 : Survival curve in severe volume targeted hemorrhagic shock (protocol 1)

(ACEI: shocked-mice treated with ACEi for 7 days ; ACEI+HOE : shocked-mice treated with ACEI for 7 days and with HOE-140 just before the shock; Control : shocked-mice); * : $p < 0,05$

	Control (n=9)	ACEi (n=11)	ACEi+HOE (n=10)
KIM-1 (2- $\Delta\Delta$ Ct)	8,2 [5-13 ,5] *	47,1 [4,3-70,9]	15,2 [4,4-24,3] *
CYSTATIN (mg/L)	0,46 [0,39-0,51]	0,47 [0,39-0,53]	0,37 [0,33-0,43] *
ALT (U/L)	50 [40-58] *	87 [68-111]	48 [38-62] *
MAP shock (MmHg)	41,7 [39,5-44,5] *	36 [31-38]	44 [40-47] *
MAP Ressuscitation (MmHg)	45 [37-52] *	37,5 [30-45]	47,2 [44-52] *

Table 1: Organic impact of moderate volume targeted hemorrhagic shock (protocol 2) Results are shown by mean (IC25%-IC75%); * = $p < 0, 05$ vs ACEi

The value 2- $\Delta\Delta$ Ct reflected the degree of induction compared to the control condition.

MAP : Mean Arterial Pressure; ALT : Alanine aminotransferase; KIM1 : Kidney Injury Molecule 1

All mice survived in the second experimentation.

Histological analysis did not reveal significant lesions of ischemia in the liver, the kidney or the distal ileum.

Discussion:

Our study reports, for the first time, the beneficial effect of acute B2R blockade in volume-targeted hemorrhagic shock to reverse the deleterious impact of ACEi-treated mice on survival.

It is nevertheless worth noting that a small amount of retrospective observational human clinical studies point in the direction of a deleterious effect of ACEi in critical situation (7).

We also show, for the first time, that this high death rate is corrected by the acute blockage of the BR2 just before the shock takes place. Such beneficial effect of BR2 antagonizing effect was previously suggested in septic (8) or hemorrhagic shock (9) models, but without preliminary treatment by ACEi. Indeed, we recently demonstrated that prior treatment by ACEi worsened hypotension and hyperlactatemia in a mice model of moderated hemorrhagic

shock, and that this worsening was reversed by a single HOE-140 injection (10). In the present study, the mortality (20%) as well as the average arterial pressure in the protocol 1's control group (mean arterial pressure (MAP) = 35 mmHg) are identical to those found by Mayeur et al in a previous work using a 35 mmHg targeted MAP HS model. Thus, the depth of our shock model, although severe, doesn't seem to be a bias in the analysis of ACEi group's significant mortality. This underlines the relevance of ACEi's over-mortality and of BR2's blockade life-saving effect.

Nevertheless, our work presents a limiting factor. We have demonstrated a low renal impact and hepatic difference in the moderated shock model. Yet, to highlight a multi-organic impact and to enable the ACEi group' survival, it has been necessary to decrease the volume of blood withdrawn by 50%. This necessity explains, in our opinion, the mild histological and biological multi-organic impacts observed in the second part of this work.

Conclusion:

In this experimental murine HS model study, we underline the deleterious effect of ACEi pretreatment. We also describe for the first time the life-saving effect of HOE-140 single injection in ACEi treated mice. At least, we suggest that this beneficial effect could be associated with a decrease in multi-organic failure.

Further work is mandatory to confirm these results. However, this benefit could be of crucial interest in ACEi-treated patients during either emergency anesthesia or resuscitation.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993 Dec 22;270(24):2957–63.
2. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med*. 1987 Jun 4;316(23):1429–35.
3. Shah M, Jain AK, Brunelli SM, Coca SG, Devereaux PJ, James MT, et al. Association between angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use prior to major elective surgery and the risk of acute dialysis. *BMC Nephrol*. 2014;15:53.
4. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 1992 Mar;44(1):1–80.
5. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med*. 1998 Oct 29;339(18):1285–92.
6. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, et al. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2131–8.
7. Auron M, Harte B, Kumar A, Michota F. Renin-angiotensin system antagonists in the perioperative setting: clinical consequences and recommendations for practice. *Postgrad Med J*. 2011 Jul;87(1029):472–81.
8. Fein AM, Bernard GR, Criner GJ, Fletcher EC, Good JT, Knaus WA, et al. Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. *JAMA*. 1997 Feb 12;277(6):482–7.
9. Christopher TA, Ma XL, Gauthier TW, Lefer AM. Beneficial actions of CP-0127, a novel bradykinin receptor antagonist, in murine traumatic shock. *Am J Physiol*. 1994 Mar;266(3 Pt 2):H867–73.
10. Charbonneau H, Buléon M, Minville V, Faguer S, Girolami J-P, Bascands J-L, et al. Acute Bradykinin Receptor Blockade During Hemorrhagic Shock in Mice Prevents the Worsening Hypotensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Crit Care Med*. 2016 Mar 17;

Etude de la mortalité et impact tissulaire du blocage aigu du Récepteur B2 de la bradykinine dans un modèle murin de choc hémorragique aigu à objectif de volume

Introduction : Evaluer les conséquences sur la mortalité et sur la défaillance multi-organique de la prémédication par inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) et l'effet d'une antagonisation du Récepteur B2 de la Bradykinine (RB2) par l'HOE-140 lors d'un état de choc hémorragique murin.

Matériel et Méthodes : Nous avons réalisé un choc hémorragique par prélèvement d'un volume de 0,6 ml de sang pour la première expérimentation et 0,3 ml pour la seconde sur une durée de 120 minutes. A la fin du choc nous avons réanimé les souris par transfusion du sang prélevé associé à un volume équivalent de Ringer lactate. Nous avons étudié 3 groupes de souris C57BL6 : IEC (souris prétraitées 7 jours par IEC avant le choc), IEC+HOE-140 (souris prétraitées par IEC pendant 7 jours avec blocage du RB2 par HOE-140 juste avant le choc) et contrôle (souris anesthésiées et choquées). Nous avons exploré dans la seconde expérimentation la défaillance d'organe, après sacrifice des souris à 24h du choc, au travers de l'étude du rein (KIM1 en RtPCR et Cystatinémie en ELISA), du foie (ALAT en Biochimie et HGF en RtPCR) et de l'intestin (ZO1 en RtPCR).

Résultats : La mortalité dans le groupe de souris prétraité par IEC a été significativement augmentée ($p < 0.05$) comparativement aux groupes IEC+HOE-140 et contrôle. L'étude de la défaillance d'organe a mis en évidence une majoration significative de l'atteinte d'organe dans le groupe IEC comparativement aux groupes IEC+HOE-140 et contrôle.

Conclusion : La surmortalité associée à la majoration de l'atteinte rénale et hépatosplanchnique dans le groupe IEC corrigé par l'antagonisation précoce du RB2 par HOE-140 est un argument robuste permettant de confirmer l'hypothèse d'un effet protecteur de l'HOE-140 lors d'un choc hémorragique chez des souris traitées par IEC.

TITRE EN ANGLAIS : Mortality and acute tissue impact of the blockade of bradykinin B2 receptor in a murine model of acute hemorrhagic shock in volume target

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : Inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC), HOE-140, Récepteur RB2 de la bradykinine, Mortalité, KIM1, cystatinémie, choc hémorragique, murin

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Nicolas MAYEUR