



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Grégoire BARTHEL

le 30 octobre 2012

BLEU DE MÉTHYLÈNE ET ADRÉNALINE, UNE ASSOCIATION SYNERGIQUE POUR LE TRAITEMENT DU CHOC ANAPHYLACTIQUE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE PROSPECTIVE CHEZ LE RAT BROWN NORWAY

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Paul-Michel MERTES
M. le Professeur Gérard AUDIBERT
M. le Professeur Bruno LEVY
M. le Professeur Hervé BOUAZIZ
M. le Professeur Jean-Marc MALINOVSKY

Président
Juge
Juge
Juge
Juge

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Grégoire BARTHEL

le 30 octobre 2012

BLEU DE MÉTHYLÈNE ET ADRÉNALINE, UNE ASSOCIATION SYNERGIQUE POUR LE TRAITEMENT DU CHOC ANAPHYLACTIQUE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE PROSPECTIVE CHEZ LE RAT BROWN NORWAY

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Paul-Michel MERTES
M. le Professeur Gérard AUDIBERT
M. le Professeur Bruno LEVY
M. le Professeur Hervé BOUAZIZ
M. le Professeur Jean-Marc MALINOVSKY

Président
Juge
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Administrateur Provisoire de l'Université de Lorraine : Professeur Jean-Pierre FINANCE
Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen « Pédagogie » : Professeur Karine ANGIOI
Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD
Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ
Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN
Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Assesseurs :

- 1^{er} Cycle :
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »
- 2^{ème} Cycle :
- 3^{ème} Cycle :
 - « DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques »
 - « DES Spécialité Médecine Générale »
- Filières professionnalisées :
- Formation Continue :
- Commission de Prospective :
- Recherche :
- Développement Professionnel Continu :

Assesseurs Relations Internationales

Professeur Bruno CHENUÉL
M. Christophe NÉMOS

Professeur Marc DEBOUVERIE

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
Professeur Francis RAPHAËL
M. Walter BLONDEL
Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
Professeur Didier MAINARD
Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
Professeur Jacques HUBERT

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY – Patrick BOISSEL
Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL
Claude CHARDOT - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE
Jean-Pierre DESCHAMPS - Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE
Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD
Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET
Christian JANOT – Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN
Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS
Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ – Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Denise MONERET-VAUTRIN
Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL
Jean PREVOT - Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT
Michel SCHWEITZER – Claude SIMON - Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET – Jean-François STOLTZ
Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT
Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeur Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIEWSKI

3^{ème} sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (*Médecine et santé au travail*)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie*)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (*Immunologie*)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (*Génétique*)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence*)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ
Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT – Professeur Thomas FUCHS-BUDER

2^{ème} sous-section : (*Réanimation médicale ; médecine d'urgence*)

Professeur Alain GERARD – Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT
Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie*)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (*Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie*)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD – Professeur Patrick ROSSIGNOL

**49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE,
HANDICAP et RÉÉDUCATION**

1^{ère} sous-section : (*Neurologie*)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE – Professeur Luc TAILLANDIER

2^{ème} sous-section : (*Neurochirurgie*)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (*Psychiatrie d'adultes ; addictologie*)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (*Pédopsychiatrie ; addictologie*)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (*Médecine physique et de réadaptation*)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (*Rhumatologie*)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie orthopédique et traumatologique*)

Professeur Daniel MOLE – Professeur Didier MAINARD
Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (*Dermato-vénéréologie*)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie*)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (*Pneumologie ; addictologie*)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (*Cardiologie*)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL
Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardiovasculaire*)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (*Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie*)

Professeur Marc-André BIGARD – Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (*Néphrologie*)

Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (*Urologie*)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER

Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeur Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteur Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteur Aude BRESSENOT

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA
3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)
Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE
1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)
Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD – Docteur Hélène JEULIN
2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)
Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ
1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)
Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN
2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)
Docteur Isabelle THAON
3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)
Docteur Laurent MARTRILLE
4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)
Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE
2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))
Docteur Lina BOLOTINE
3^{ème} sous-section : (Immunologie)
Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT
4^{ème} sous-section : (Génétique)
Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**
3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)
Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER
50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE
1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)
Docteur Anne-Christine RAT
3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)
Docteur Anne-Claire BURSZTEJN

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE
1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)
Docteur Laure JOLY

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**
3^{ème} sous-section :
Docteur Olivier MOREL
5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)
Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE
Docteur Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE
Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Mr Nick RAMALANJAONA

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA
Madame Nathalie MERCIER

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE

Madame Nadine MUSSE

PROFESSEURS ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Francis RAPHAEL

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Jean-Louis ADAM

Docteur Paolo DI PATRIZIO

Docteur Sophie SIEGRIST

Docteur Arnaud MASSON

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Jean-Marie ANDRÉ - Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY – Professeur Patrick BOISSEL

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ

Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Michèle KESSLER - Professeur Henri LAMBERT

Professeur Alain LARCAN - Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Pierre MONIN

Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON

Professeur Jacques POUREL – Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER

Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Paul VERT

Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)

Professeur Paul MICHELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)

Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)

Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)

Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)

Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de
Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô
Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)*

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
*Research Institute for Mathematical Sciences
de Kyoto (JAPON)*

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würtzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Avant-Propos

Cette thèse a été rédigée sous forme d'article, soumis et accepté par *Critical Care Medicine* le 16 juin 2012 (référence : CCMED-D-12-00033R2) avec pour titre :

Methylene blue and epinephrine, a synergetic association for anaphylactic shock treatment

Dédicaces

A notre Maître et Président de thèse,

Monsieur le Professeur Paul-Michel MERTES,
Professeur d'Anesthésiologie-Réanimation Chirurgicale.

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en nous confiant ce travail de recherche.

Nous vous remercions de nous faire l'honneur de présider cette thèse et de juger ce travail.

Nous avons beaucoup appris à votre contact. Votre enthousiasme et votre passion pour la recherche nous ont permis de persévérer dans les moments de doute. Votre sens clinique enraciné dans la physiopathologie et allié à l'outil échographique nous ont permis d'appréhender et d'apprécier l'Anesthésie-Réanimation comme une spécialité dynamique et innovante permettant une amélioration continue de sa pratique.

Vous nous avez initiés à la production scientifique, et nous sommes heureux d'avoir pu bénéficier de votre expertise.

Nous nous réjouissons de poursuivre avec vous l'exploration de cette thématique de recherche.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur Gérard AUDIBERT,
Professeur d'Anesthésiologie-Réanimation Chirurgicale.

Nous apprécions l'honneur que vous nous faites en jugeant ce travail.

Nous vous remercions de votre implication dans les différentes étapes de ce travail, de la
paillasse à l'écriture du papier en passant par l'analyse des échantillons et la présentation de
notre travail aux congrès.

Nous avons apprécié votre disponibilité et votre enthousiasme.

Nous vous remercions de nous accueillir pendant au moins deux ans dans votre équipe.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur Bruno LEVY,
Professeur de Réanimation Médicale.

Nous apprécions l'honneur que vous nous faites en jugeant ce travail.

Nous vous remercions de nous avoir accueillis dans votre laboratoire, de votre aide dans l'élaboration du protocole et la relecture et la correction de l'article.

Soyez assurés de notre reconnaissance.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur Hervé BOUAZIZ,
Professeur d'Anesthésiologie-Réanimation Chirurgicale.

Nous sommes heureux que vous nous fassiez l'honneur de juger ce travail.

Nous avons été très satisfaits de notre passage dans les différents sites d'anesthésie loco-régionale dont vous avez la responsabilité. Nous vous sommes reconnaissants de la qualité de vos cours centrés sur la pratique clinique (en particulier ceux sur l'échographie et la gestion des complications en ALR). Nous avons apprécié votre sollicitude et votre bienveillance.

Nous nous vous remercions de nous accueillir pendant au moins deux ans dans votre service.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le professeur Jean-Marc MALINOVSKY,
Professeur d'Anesthésiologie-Réanimation Chirurgicale.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en jugeant ce travail.

Nous vous remercions de votre implication fidèle dans ce travail de recherche, dans toutes les étapes de sa réalisation : critiques et compréhension des résultats, correction des travaux d'écriture et répétition des présentations.

Soyez assurés de notre reconnaissance.

A mes collègues de l'hôpital,

A tous les médecins, infirmières, infirmières-anesthésistes, sages-femmes, aides-soignants, brancardiers, ASH, que j'ai côtoyé dans les services d'anesthésie-réanimation, de réanimation et l'ensemble des services médico-chirurgicaux au cours de mon internat.

Merci à l'équipe d'anesthésie du Centre Hospitalier Régional Bel-Air de Thionville (Drs Fritz, Berens, Colombo, Brugerolle, Kwan-Ning, Mansard, Wilmet), de m'avoir initié à l'anesthésie au sein de votre bloc polyvalent.

Merci au Pr Favier, au Drs Pernod, Plancade, Nadaud et Landy et à l'équipe de la réanimation de l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest, de m'avoir initié aux gestes techniques et à l'échographie.

Merci aux équipes de Tête et Cou (Drs Masson, Torrens, Issenhuth, Girard, Bauman, Luckner, Per, Frent, Brezeanu, Rosu, Aissa, Bertrand, Taron, Marchand, Belut, Cornet, Giorgi, Bur, Lichnewsky, Pop, Bousquet, Herbain) de COT-ATOL (Drs Heck, Pourel, Lambert, Marchand, Lichnewsky Lambert, Chalot, Beley, Boudour), de Chirurgie C (Drs Junke, Fossard, Ancel, Dupays, Guidat, Vivin, Leclercq, Rabarijaona, Rubin, Schmartz, Reut, Vasilescu, Hoff, Rocq, de CGU (Drs Boulanger, Fuhrer, Houot, Lerintiu, Guibert, Laurent) et de Chirurgie Cardiaque (Clavey, Mattei, Hottier, Hubert, Delolme, Hirschi, Parlanti, Stancu, Kara) du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, de l'Hôpital Belle-Isle (Drs Caremelle, Cloez, Graff, Haessler, Hassenforder, Pierron, Robert, Tresse), de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy (Drs Boileau, Baka, Barthelet, Vial, Savoye, Michel) du Centre Emile Gallé (Drs Burdin, Chastel, Robaux, Gervais, Mekler, Diarra, George). Merci pour vos exemples de rigueur et de m'avoir fait confiance.

Aux professeurs Meistelman, Fuchs-Buder, merci de votre accueil dans votre service, merci pour votre implication pédagogique.

Aux professeurs Bollaert et Gibot, aux docteurs Nace, Cravoisy, Barraud et Conrad, Tatopoulos et Lemoine et à l'équipe de la Réanimation Médicale Polyvalente merci pour votre enseignement et un merci spécial à Marie et Alexandre d'avoir contribué à mon épanouissement personnel ...

Aux docteurs Charpentier, Garric et Welfringer, et à l'équipe de Réanimation chirurgicale merci pour votre accueil et pour les nuits passés ensemble, merci de m'avoir aidé à développer rigueur et efficacité pour la prise en charge des polytraumatisés.

Au Dr Richard Jacson, d'Epinal, qui lors de mon stage infirmier en deuxième année, m'a interpellé par son plaidoyer en faveur de l'anesthésie-réanimation, discipline riche et diversifiée, prenant en charge globalement le patient.

Merci à tous d'avoir contribué à forger le médecin et l'homme que je suis aujourd'hui. Avec vous j'ai appris à aimer travailler en équipe, merci de l'ambiance toujours amicale et souvent détendue que vous avez su entretenir.

A tous les patients que j'ai été amené à prendre en charge et qui m'ont permis petit à petit d'acquérir de l'expérience.

A mes collègues du laboratoire,

A Chantal et Feng sans qui ce travail n'aurait pas été possible. J'ai été très heureux de « travailler » avec vous, qui avez été toujours de bonne humeur, disponible et de bon conseil.

A Olivier Collange, Simon Thornton, au Professeur Dan Longrois, merci d'avoir contribué à valoriser ce travail.

Merci également à Marc, Maud et Youcef, Nacira, Charlène, Khodor, Amir, Gilles, Julie pour vos conseils et l'ambiance détendue.

Merci au Dr Clothilde Latache pour son aide précieuse pour les statistiques et à toutes les personnes que j'ai connu pendant mon année d'internat de Santé Publique qui m'ont permis par leur enthousiasme (en particulier Paul) d'entrouvrir la porte du domaine de la recherche.

Merci François pour ton aide logistique ...

A ma famille,

A ma fille, Léopoldine, merci d'avoir fait de moi un papa. Merci pour tes sourires et ton babillage en espérant que tu sois plus loquace que ton père. Je t'aime, ma fille.

A ma femme, Servane, merci d'avoir fait de moi le plus heureux des maris. Merci pour ton soutien pendant cette année studieuse où l'accouchement le plus difficile pour toi a été celui de ma thèse et de mon mémoire. Merci pour ta douceur et ton amour fidèles. Avec toi, je ne suis plus du tout timide. Je t'aime, ma femme.

A mes parents, merci de m'avoir donné la vie et tout votre amour. Merci pour votre exemple de couple et de parents. Vous n'avez pas réussi à me dissuader de persévérer dans le choix de la médecine malgré vos gardes et vos week-ends d'astreinte. Recevez toute ma reconnaissance et mon amour.

A mes frères et à ma sœur, vous comptez pour moi et vous savez que vous pourrez toujours compter sur moi.

Pierre-Yves, petit frère de 18 mois de moins que moi, mais thésé un an avant, bien que tu sois devenu chirurgien, tu as su rester simple et attentif à ceux qui t'entourent. Merci pour tous ces moments que nous avons partagés ensemble. Nous avons vécu des crises ensemble, merci pour ton soutien indéfectible.

Gautier, tu as de grandes qualités qui n'attendent que courage, confiance en toi et persévérance pour s'épanouir complètement. Ton humour est une force et un exemple pour moi. En tant que grand frère j'ai pu garder avec toi mon âme d'enfant.

Emeline, merci pour toutes tes petites attentions pour moi, Servane et Léopoldine. L'humour est aussi une de tes grandes qualités, nécessaire pour faire front à trois grands frères. Ton grand cœur devrait tenir bon face à un petit ECN de rien du tout.

L'expression des sentiments n'est pas mon fort, mais soyez assurés de mon amour fraternel, mon dévouement pour vous en est le témoin.

A marraine Simone et Jean-Marie, ma tatie Michelle, Véronique, Frédéric, Guillaume et ma filleule Hélène, Dominique, William et Léa, Michel, Dominique, Anne-Pauline, Marine et Domitille, à ma belle famille, Michel, Catherine, Donat et Oriane, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Aux disparus toujours trop tôt auxquels je ne pense pas toujours assez : mes grands-parents, Michel, madame Martin.

A mes amis,

De la première heure, Jean-Sébastien, Jean-Baptiste, Maël et Christophe, j'étais bien timide à l'époque, j'ai pu me construire avec vous et devenir moins sage.

Aux amis de la fac, Annick, Mélanie et Mayo, Cédric, Jean-Noël, Siavoche, Vincent, Jean-Baptiste, Alexandre et Asaël vous qui m'avez dévergondé (après la P1) malgré ma timidité, vous m'avez tellement apporté ...

A mes compagnons d'internat, Barbara, Christian, David, Julien Nadaud, Alexandre Lai, Alice, Claude, Grégory, Aurélien, Sébastien Daval, Delphine, Alia, Philippe, Gilles, Julien Deguis, Régis, Olivier Untereiner, Mickaël, Arcadius, Nicolas Ducrocq, Alexandre Grosjean, Erika, Laurène, Sylvain, Cristina, Pierre, Cyril, Jean-Louis, Cyril, Marc, Olivier Breton, Sébastien Mory, Sébastien Brua, Thomas et tous les internes et ACC du DAR Central-Brabois. Vous avez été des amis, appuis, confidents, des confrères au sens plein.

Serment

"Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque".

Table des matières

Abréviations utilisées :	20
1. Introduction :	21
2. Matériels et méthodes :	23
2.1. Soins apportés aux animaux :	23
2.2. Protocole de sensibilisation :	23
2.3. Mise en condition de l'animal :	23
2.4. Protocole spécifique pour l'étude du muscle squelettique :	24
2.5. Protocole spécifique pour l'étude du cerveau :	24
2.6. Induction du choc anaphylactique et administration des traitements :	25
2.7. Western Blot :	26
2.8. Analyses statistiques :	26
3. Résultats :	27
3.1 Données hémodynamiques systémiques :	29
3.2 Effets des différents traitements sur la physiologie cérébrale :	29
3.3 Effets des différents traitements sur la physiologie musculaire :	32
3.4 Evolution des paramètres biochimiques sanguins :	33
3.5 Expression de la caspase 3 activée et d'HIF-1 α au niveau du cortex cérébral :	34
4. Discussion :	35
4.1. Résultats principaux :	35
4.2. Choix, dose, effets du bleu de méthylène :	35
4.3. Place du bleu de méthylène dans la modulation de la voie du NO :	36
4.4. Effets de l'adrénaline :	37
4.5. Effets de l'association bleu de méthylène-adrénaline :	37
4.6. Discordance entre la correction de la PAM et du DC :	38
4.7. Limites de l'étude :	39
4.8. Perspectives :	39
5. Conclusion :	41
Bibliographie :	42
Annexes :	47
Annexe 1 : Schéma des différents mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la vasorelaxation induite par le NO :	47
Annexe 2 : Schéma général des voies de signalisation des catécholamines et du NO pour la régulation de la contractilité la cellule musculaire lisse :	48

Abréviations utilisées :

AD : adrénaline
AD-BM : association adrénaline et bleu de méthylène
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
BM : bleu de méthylène
CA : choc anaphylactique
CON : contrôle
DC : débit cardiaque
DSC : débit sanguin cérébral
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
HIF-1 α : facteur induit par l'hypoxie
L-NAME : N^G-nitro-L-arginine-méthyl ester
NO : monoxyde d'azote
NOSn : NO synthase neuronale
OVA : ovalbumine
PAM : pression artérielle moyenne
PtiO_{2c} : pression partielle en oxygène cérébrale
PtiO_{2m} : pression partielle en oxygène musculaire
RLPc : ratio lactate/pyruvate interstitiel cérébral
RLPm : ratio lactate/pyruvate interstitiel musculaire
UP : unité de perfusion
UA : unité arbitraire

1. Introduction :

Le choc anaphylactique (CA) est une complication péri-opératoire à laquelle l'anesthésiste-réanimateur est confronté plusieurs fois dans sa carrière, sa prévalence mondiale est de 1 à 9 pour 10 000 anesthésies générales [1]. Le CA est une réaction brutale, potentiellement létale, appartenant aux réactions d'hypersensibilité immédiate pour lequel deux mécanismes physiopathologiques très différents existent : les HSI non allergiques et les HSI allergiques (de nature immunologique), souvent plus sévères sur le plan clinique. Par conséquent sa reconnaissance et son traitement rapides sont des enjeux importants pour l'anesthésiste-réanimateur. Au cours de l'anesthésie, ce choc induit une mortalité de l'ordre de 3 à 10% [2, 3] et peut être aussi responsable de sévères morbidités (anoxie cérébrale).

L'adrénaline (AD), traitement vasopresseur de référence, peut échouer à restaurer rapidement une perfusion d'organe adéquate ou même être complètement inefficace. Dans ce cas on parle alors de choc réfractaire aux catécholamines, dont les mécanismes restent inconnus [4, 5].

Le choc anaphylactique est classifié habituellement parmi les chocs distributifs. Il se caractérise par une hypovolémie résultant d'une augmentation très importante de la perméabilité capillaire et par une hypotension artérielle secondaire à une vasodilatation excessive.

Des études récentes apportent des données supplémentaires sur la physiopathologie de l'anaphylaxie la rendant plus complexe qu'un choc purement distributif. Une diminution de la contractilité myocardique, une augmentation de la pression veineuse dans les territoires splanchnique et portale ainsi qu'au niveau pulmonaire et une diminution sévère de la pression de perfusion au niveau du muscle squelettique ont été démontrées [6-11]. Les conséquences de l'anaphylaxie sur la perfusion et le métabolisme cérébraux restent à déterminer. Leur prise en compte est incontournable pour établir des stratégies et des objectifs thérapeutiques [12].

Les effets du CA sur les fonctions d'organes mentionnées ci-dessus sont la conséquence de la libération explosive de médiateurs comme l'histamine, le PAF, les leucotriènes, le TNF- α [13, 14] qui activent de multiples voies de signalisation cellulaires. Celles-ci incluent, entre autres, celle du monoxyde d'azote (NO) [15].

Malgré l'effet dépresseur myocardique documenté du NO [16] et les bénéfices potentiels liés à son inhibition, les effets de l'inhibition pharmacologique de la voie du NO sur la survie immédiate dans le CA restent contradictoires. Ils varient selon les modèles expérimentaux, les espèces animales et les inhibiteurs de la voie du NO utilisés [17-19]. L'inhibition de la voie du NO pourrait avoir des effets bénéfiques sur certains organes (par exemple le cœur) et délétères sur d'autres (par exemple le cerveau).

Par ailleurs, les interactions entre l'adrénaline et les différents agents pharmacologiques inhibant la voie du NO n'ont pas été étudiées de façon approfondie, et en particulier l'administration de bleu de méthylène en curatif dans un modèle de choc anaphylactique expérimental n'avait été étudiée que chez le lapin [18]. Le bleu de méthylène (BM) est un agent pharmacologique connu pour inhiber un des effecteurs finals du NO : la guanylate cyclase (annexe 1).

Ainsi l'objectif de notre étude était de déterminer le rôle bénéfique ou délétère du BM seul ou en association avec l'AD, sur la survie immédiate, l'hémodynamique, la disponibilité tissulaire en oxygène et les perturbations métaboliques, et en particulier sur les conséquences cérébrales, dans un modèle de choc anaphylactique médié par les IgE chez le rat anesthésié.

Puisque les conséquences à long-terme des traitements ne pouvaient être évaluées à cause de la lourdeur des procédures chirurgicales nécessaires à notre expérimentation, l'expression de la caspase-3 activée et d'HIF-1 α était utilisée comme des marqueurs des lésions retardées induites par le choc anaphylactique au niveau du cortex cérébral.

2. Matériels et méthodes :

2.1. Soins apportés aux animaux :

Les procédures de l'animalerie, les soins apportés aux animaux et les protocoles expérimentaux étaient conformes à la directive du conseil des communautés européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE) et aux recommandations du comité d'éthique de l'INSERM.

Des rats Brown Norway (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) de 10 semaines, pesant entre 250 et 300g étaient utilisés pour cette expérimentation après une période d'acclimatation de 7 jours après réception. Ils étaient hébergés dans notre animalerie dans des conditions contrôlées (température 22-24°C, humidité 55-60%, cycles jour-nuit de 12 heures). Les animaux avaient un libre accès à la nourriture et à l'eau.

2.2. Protocole de sensibilisation :

Après la semaine d'acclimatation, à J0, J4 et J14, les rats étaient sensibilisés par une injection sous-cutanée d'1 mg d'ovalbumine grade VI (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et de 4 mg d'hydroxyde d'aluminium, en adjuvant (Sigma, St Louis, USA) dilués dans 1ml de sérum salé isotonique. Ce protocole avait déjà été mis en place dans notre unité de recherche [20].

2.3. Mise en condition de l'animal :

La procédure chirurgicale était réalisée 21 jours après le début de la sensibilisation. En décubitus dorsal, une anesthésie générale en ventilation spontanée était induite dans une chambre d'inhalation avec une fraction inspirée d'isoflurane à 3% en oxygène pur ; elle était entretenue avec une fraction inspirée à 1%. La trachée était canulée pour la mise en place d'une ventilation assistée contrôlée en oxygène pur par un respirateur dédié à la ventilation des rongeurs (Harvard rodent respirator, modèle 683, Harvard Apparatus, Cambridge, USA).

Les variations interindividuelles de poids des rats étant faibles, il a été possible de déterminer des paramètres ventilatoires fixes permettant d'obtenir des paramètres gazométriques conformes à la physiologie du rat (PaCO_2 entre 35 et 45 mm Hg) sans avoir recours à des gaz du sang itératifs, ayant un impact sur la volémie des rats. Le volume courant était réglé à 3 ml et la fréquence respiratoire à 60/min.

La température rectale était monitorée et maintenue à $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ tout au long de l'expérimentation grâce à une lampe chauffante. Un cathéter (DI : 0,58 mm, DE : 0,96 mm, Biotrol Diagnostic, Chennevières Les Louvres, France) était inséré dans la veine fémorale gauche pour l'administration des différents traitements et la perfusion de sérum salé isotonique au débit de $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ afin de compenser les besoins physiologiques de base et le jeûne. Un autre cathéter était inséré dans l'artère fémorale gauche pour le monitoring de la pression artérielle. La pression artérielle moyenne était enregistrée en continu grâce à un capteur de pression préalablement calibré (DA-100, Biopac Systems, Northborough, USA).

Le métabolisme cérébral et musculaire squelettique était étudié de façon séparée au cours de deux séries d'expérimentation indépendantes.

2.4. Protocole spécifique pour l'étude du muscle squelettique :

Un cathéter-thermistance était inséré dans le ventricule gauche via l'artère carotide gauche pour la mesure discontinue du débit cardiaque par thermodilution (bolus froid) grâce à l'interface Cardiomax III connectée à un ordinateur (Cardiomax III, Columbus Instrument, USA). La peau au niveau du cou était refermée par des agrafes afin d'éviter les mobilisations du cathéter.

Une électrode à oxygène flexible pré-étalonnée (sonde de Clark, diamètre : 0,5 mm, aire de sensibilité : 4mm², LICOX CC1.R, Integra NeuroSciences, France) était introduite, grâce à un cathéter veineux 20G servant de guide, dans le muscle quadriceps droit. Elle était connectée au moniteur LICOX CMP pour la mesure de la pression tissulaire musculaire en oxygène (mPtiO₂, mm Hg).

Une sonde de microdialyse, linéaire et flexible, était implantée grâce à un introducteur dans le muscle quadriceps gauche comme décrit précédemment [8]. C'était une sonde CMA 20 Elite, membrane en polyarylethersulfone, de longueur 10 mm, de diamètre 0,5 mm, avec un seuil de perméabilité à 20 kDa (CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Suède). A température ambiante, la sonde était perfusée par du Ringer sans lactate stérile (soluté de perfusion CMA T1, composition : Na⁺ 147 mmol/L, K⁺ 4 mmol/L, Ca²⁺ 2,3 mmol/L, Cl⁻ 155,6 mmol/L). La sonde était connectée à une microseringue de 2,5 ml (CMA/106) montée sur une pompe à microinjection (CMA 107, Microdialysis Pump), le débit de perfusion était de 2 µl/min. Les sondes étaient réutilisées à 5 reprises. Une période d'équilibration des échanges de 30 minutes était nécessaire avant de débuter le recueil des échantillons. Les échantillons de microdialysats étaient collectés toutes les 10 minutes dans des microtubes (CMA), le recueil débutant 10 minutes avant l'induction du choc et se poursuivant jusqu'à la fin de l'expérimentation. Durant l'expérimentation les microtubes étaient placés dans la glace et ensuite conservés à - 20°C. Le lactate, le glucose, le pyruvate et le glutamate interstitiels étaient dosés par un analyseur dédié (CMA 600).

La période d'équilibration de la sonde de microdialyse de 30 minutes coïncidait avec la phase de stabilisation de l'animal après la chirurgie.

2.5. Protocole spécifique pour l'étude du cerveau :

En décubitus ventral, l'animal était installé dans un cadre de stéréotaxie afin d'insérer les sondes cérébrales au travers de trous de trépan réalisés avec un mini-foret. Les coordonnées de stéréotaxie ont été déterminées grâce à un atlas stéréotaxique du cerveau du rat blanc [21].

Une électrode à oxygène flexible pré-étalonnée (LICOX CC1.R, Integra NeuroSciences, France) était insérée au niveau de l'hippocampe (4,6 mm en avant et 2 mm latéralement de la fontanelle lambda, à une profondeur de 3 mm) pour la mesure de la pression tissulaire cérébrale en oxygène (PtiO₂c, mmHg).

Cette sonde a été réutilisée environ 7 fois. Avant chaque utilisation, elle était vérifiée et jugée opérationnelle si, après avoir été plongée 5 min dans du sérum physiologique dans lequel bullait de l'oxygène, la PtiO₂ atteignait 400 mmHg. Les sondes étaient conservées dans du sérum physiologique au réfrigérateur.

Le débit sanguin cérébral (DSC) était mesuré au niveau cortical (en unité arbitraire : unité de perfusion (UP)) par une sonde-aiguille doppler-laser (sonde 411, diamètre 450 µm, PERIFLUX systems ; constante de temps, 3). Elle était connectée au moniteur Periflux PF 5010 (PERIMED AB, Stockholm, Suède). Elle était insérée dans le cortex cérébral droit, 2 mm en avant de l'électrode à oxygène. La sonde doppler-laser était étalonnée chaque jour avant le début des expérimentations avec une solution délivrée par le constructeur.

Une sonde de microdialyse, de conception adaptée au système nerveux central était implantée grâce à un introducteur dans le striatum, 7,3 mm en avant, 4 mm latéralement de la fontanelle lambda à une profondeur de 6 mm. C'était une sonde CMA/12, membrane en polyarylethersulfone de longueur 3 mm, diamètre 0,5 mm, seuil de perméabilité à 20 kDa (CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Suède). Le protocole concernant l'utilisation de la sonde, le recueil et le dosage des microdialysats était similaire au protocole suivi pour l'étude du muscle, seul le soluté de perfusion différait (soluté spécifique pour le système nerveux central, CMA CNS, composition : Na^+ 147 mmol/L, K^+ 2,7 mmol/L, Ca^{2+} 1,2 mmol/L, Mg^{2+} 0,85 mmol/L, Cl^- 153,8 mmol/L).

2.6. Induction du choc anaphylactique et administration des traitements :

Après une période de stabilisation de 30 minutes, un choc anaphylactique était induit par l'administration intraveineuse d'1 mg d'ovalbumine (T0). Les animaux avaient été randomisés au préalable en 5 groupes. Le choc n'était pas induit dans le groupe contrôle (groupe CON), l'ovalbumine était remplacée par du sérum physiologique. Les animaux ne recevaient pas de traitement dans le groupe ovalbumine (groupe OVA), seulement du bleu de méthylène (groupe BM), seulement de l'adrénaline (groupe AD) ou l'association des 2 traitements (groupe AD-BM). Les traitements n'étaient pas administrés en aveugle. Un bolus unique de bleu de méthylène (Sigma, Saint-Louis, USA) de 3mg/kg était injecté 3 minutes après l'induction du choc (T3). Les doses d'adrénaline avaient été déterminées lors d'un précédent travail de notre équipe [22]. Le premier bolus d'adrénaline de 2,5 μg était injecté à T3 et un second à T5, une perfusion continue d'adrénaline à 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ était débutée immédiatement après le premier bolus. Lorsque les deux traitements étaient associés, le bolus de BM était administré immédiatement après celui d'AD. Tous les rats ont reçu au total la même quantité de sérum physiologique.

La pression artérielle moyenne (PAM), le débit sanguin cérébral (DSC), la PtiO_2 cérébrale et musculaire (PtiO_{2c} et PtiO_{2m}) étaient recueillis à différents instants dans le temps : T0 (avant l'induction du choc), T 1 minute, T 2,5, T 5, T 7,5, T 10, T 12,5, T 15, T 17,5, T 20 puis toutes les 5 minutes jusqu'à la fin de l'expérimentation. 0,5 ml de sang artériel était prélevé avant l'induction du choc et 1 ml à la fin du protocole. Les gaz du sang, la natrémie, la lactatémie, l'hémoglobininémie, la glycémie étaient dosés par un automate dédié à la biologie décentralisée.

Les concentrations plasmatiques en nitrites et nitrates n'ont été mesurées qu'à la fin du protocole afin de limiter la déperdition sanguine, 0,5 ml de sang était centrifugé (4000 rpm pendant 15 min à 4°C) et le plasma stocké à -80°C. Avant le dosage, les échantillons étaient déprotéinisés par ultrafiltration (VIVASPIN 500, membrane polyethersulfone, 5000 MWCO, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) : 15 min à 13000 rpm à 4°C. A partir d'échantillons dilués, la concentration de nitrite était mesurée par spectrophotométrie grâce à la réaction de Griess. Une deuxième série de dosages était réalisée après réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase, une concentration totale de nitrite était ainsi obtenue, la concentration de nitrate était déduite par la différence de concentration entre ces deux dosages (trousse ELISA, PARAMETER™, KGE001, R&D systems, Abingdon, Angleterre).

A la fin du protocole, 60 minutes après l'induction du choc et après recueil des échantillons sanguins, les animaux étaient euthanasiés, par une dose létale de thiopental.

Les tissus cérébraux corticaux étaient rapidement prélevés et immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

2.7. Western Blot :

Les cortex cérébraux ont été homogénéisés rapidement grâce à des microbilles (Tissue-Lyser II, Qiagen, Courtaboeuf, France) dans un tampon de lyse (Phosphosafe™, Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, Angleterre). La concentration en protéines des échantillons était dosée selon la méthode de Bradford (Pierce, ThermoScientific, Brebières, France).

20 µg d'extraits de protéines étaient déposés sur un gel de polyacrylamide (Bis-Tris 4-12% Criterion XT, BioRad, Marne-la-Coquette, France) et séparés selon leur taille par électrophorèse. Puis le transfert était effectué sur une membrane en PVDF (polyfluorure de vinylidène, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Les sites de fixation aspécifiques de la membrane étaient saturés (2 heures) par du lait écrémé en poudre à 5% dilué dans du TBS-T (Tris-HCL contenant 0,1% de Tween 20). Les membranes étaient incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines à doser HIF-1α (1:2000; Abcam, Paris, France), caspase 3 clivée (1:1000; Cell Signaling, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) et la β-actine qui était utilisée comme témoin du dépôt des protéines et pour la normalisation des quantifications.

Après 6 lavages de 5 minutes au TBS-T 0,1%, les membranes étaient incubées à température ambiante pendant une heure avec l'anticorps secondaire IgG (1:2000, Cell Signaling, Ozyme, St. Quentin Fallavier, France) conjugué à la peroxidase de raifort (horseradish peroxidase-conjugated (HRP)). Finalement, les membranes étaient lavées de nouveau 6 fois 5 minutes avec du TBS-T 0,1%.

L'acquisition et la quantification des signaux des anticorps fixés se faisaient par densitométrie à l'aide de l'imageur LAS-4000 (FSVT, Courbevoie, France) et du logiciel Multi-Gauge (LifeScience, Fujifilm, France). Après les analyses densitométriques, les valeurs de densité optique étaient exprimées en unités arbitraires (UA).

2.8. Analyses statistiques :

Les résultats sont exprimés, sauf mention contraire, tels que : moyenne ± ESM. Les différences intra-groupe et inter-groupes étaient testées par une analyse de la variance pour mesures répétées à 1 et 2 facteurs à l'aide du logiciel Staviw® (SAS Institute Inc., Cary, Caroline du Nord, Etats-Unis).

Pour la comparaison des traitements, une ANOVA à 2 facteurs était utilisée pour les données recueillies à partir de la 5^{ème} minute (premier point de recueil des données après le début des traitements à T 3 minutes). Quand une interaction significative était détectée entre les groupes par l'ANOVA, une analyse post-hoc 2 à 2 des groupes était réalisée par un test de Fisher.

Les différences statistiques étaient considérées comme significatives si $p < 0,05$.

3. Résultats :

Soixante rats Brown-Norway sensibilisés à l'ovalbumine (274 ± 4 g) étaient randomisés en 5 groupes ($n = 12$ par groupe) entre les groupes CON (pas de choc), OVA (pas de traitement), BM, AD et AD-BM. Comme tous les animaux du groupe OVA étaient morts au bout de 15 minutes, les données de la microdialyse, de la biologie moléculaire et de la biochimie plasmatique n'étaient pas exploitables pour ce groupe. Les paramètres de l'hémodynamique et du métabolisme musculaires et cérébraux restaient stables chez les animaux contrôles pendant toute la période d'expérimentation.

Tableau 1. Evolution des concentrations interstitielles cérébrales en lactate, pyruvate et glucose ($n = 6$ rats/groupe).

Molécule	Intervalles De temps (min)	CON	BM	AD	AD-BM
Lactate (mM)	T-10 to T0	$0,32 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,14$	$0,27 \pm 0,04$
	T0 to T10	$0,23 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,01$
	T10 to T20	$0,30 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,11^b$	$0,40 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,06$
	T20 to T30	$0,25 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,12^b$	$0,40 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,10$
	T30 to T40	$0,24 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,13^b$	$0,36 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,08$
	T40 to T50	$0,24 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,14$	$0,31 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,08$
	T50 to T60	$0,24 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,06$
Pyruvate (mM)	T-10 to T0	$0,020 \pm 0,003$	$0,012 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,003$	$0,015 \pm 0,004$
	T0 to T10	$0,017 \pm 0,002$	$0,015 \pm 0,003$	$0,011 \pm 0,002$	$0,012 \pm 0,002$
	T10 to T20	$0,017 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,004$	$0,012 \pm 0,003$	$0,023 \pm 0,006$
	T20 to T30	$0,016 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,003$	$0,011 \pm 0,003$	$0,022 \pm 0,005$
	T30 to T40	$0,016 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,003$	$0,012 \pm 0,003$	$0,016 \pm 0,004$
	T40 to T50	$0,017 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,002^b$	$0,010 \pm 0,003$	$0,017 \pm 0,005^a$
	T50 to T60	$0,016 \pm 0,002$	$0,008 \pm 0,003$	$0,010 \pm 0,003$	$0,010 \pm 0,003$
Glucose (mM)	T-10 to T0	$0,22 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,07$	$0,26 \pm 0,05$
	T0 to T10	$0,25 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,03$
	T10 to T20	$0,35 \pm 0,09$	$0,071 \pm 0,03^b$	$0,23 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,04^a$
	T20 to T30	$0,23 \pm 0,08$	$0,11 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,05^a$
	T30 to T40	$0,23 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,03^a$	$0,34 \pm 0,05^a$
	T40 to T50	$0,27 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,04^a$	$0,38 \pm 0,06^a$
	T50 to T60	$0,25 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,28 \pm 0,07^a$

L'instant 0 (T0) correspond à l'injection d'ovalbumine. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne $\pm$ ESM. ^a $p \leq 0,05$ vs le groupe BM, ^b $p \leq 0,05$ vs le groupe CON.

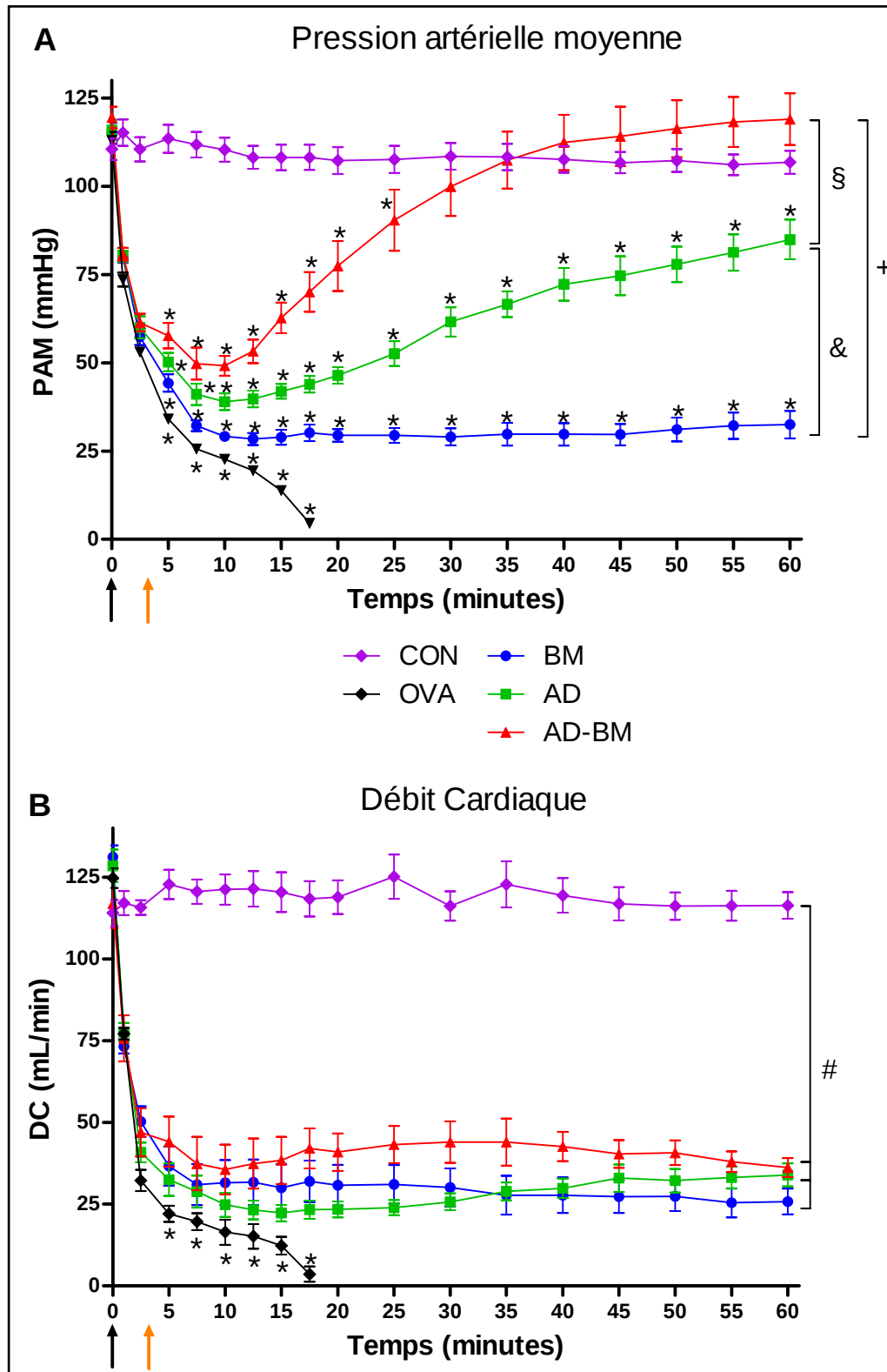


Figure 1. Evolution de la pression artérielle moyenne (PAM) (A, n = 12 rats/groupe) et du débit cardiaque (DC) (B, n=6 rats/groupe) dans les groupes Ovalbumine (OVA), Contrôle (CON), Bleu de Méthylène (BM), Adrénaline (AD) et Adrénaline associée au Bleu de Méthylène (AD-BM). ↑ correspond à l'injection d'ovalbumine et ↑ au début du traitement. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne $\pm$ ESM. *p $\leq$ 0,05 versus le groupe CON, ⁺p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD-BM versus BM, [&]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD versus BM, [§]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD-BM versus AD, [#]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD-BM ou AD ou BM versus CON.

3.1 Données hémodynamiques systémiques :

L'évolution au cours du temps des profils hémodynamiques (PAM et DC) était différente selon les groupes (figure 1). L'état hémodynamique des animaux restait stable tout au long de la période d'expérimentation dans le groupe CON, alors que l'injection d'ovalbumine induisait de façon constante et similaire une rapide et importante diminution de la PAM et du DC dans les autres groupes. En l'absence de traitement, les animaux étaient tous morts au bout de 15 minutes après une sévère chute du DC et de la PAM, alors que les animaux traités survivaient jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Le BM seul permettait de stabiliser la PAM mais à des valeurs basses (30 mmHg). Dans le groupe AD la PAM réaugmentait progressivement pour atteindre 70% de sa valeur basale à la fin de l'expérimentation et dans le groupe AD-BM elle était complètement restaurée à partir de la 30^{ème} minute.

Les trois traitements amélioraient le DC par rapport au groupe OVA. Après sa diminution initiale, le DC restait stable mais à des valeurs basses dans le groupe BM. L'adrénaline seule ou en association avec le BM restaurait partiellement le DC à 26% et 31%, respectivement, de ses valeurs basales, mais sans différence significative entre les 3 groupes traités.

3.2 Effets des différents traitements sur la physiologie cérébrale :

Sans traitement, une rapide et importante diminution du DSC cortical et de la PtiO_{2c} survenait après l'induction du choc (figures 2A et 2B).

Une diminution similaire du DSC se constituait dans les groupes traités jusqu'à 12,5 minutes après l'induction du choc. Puis le DSC se stabilisait à des valeurs basses dans le groupe BM, il passait de 106 ± 2 à 22 ± 3 UP (unité de perfusion) alors que l'AD seule ou en association avec le BM le restaurait partiellement (respectivement à 55% et 77% de sa valeur basale, figure 2A).

Après l'induction du choc, une baisse significative de la PtiO_{2c} se constituait initialement dans chaque groupe traité.

Dans une seconde phase, contrairement aux autres groupes traités, la disponibilité en oxygène continuait de diminuer légèrement avec le temps dans le groupe BM jusqu'à passer sous le seuil d'ischémie cérébrale (PtiO_{2c} < 20 mmHg) à partir de la 25^{ème} minute. Ce passage en ischémie cérébrale identifié par la PtiO_{2c} était corroboré par la microdialyse cérébrale qui montrait la diminution des concentrations en glucose (tableau 1), l'augmentation progressive du ratio lactate/pyruvate (RLP, figure 2C) et la libération de glutamate (figure 2D) au niveau interstitiel dans le striatum.

L'adrénaline seule ou en association avec le BM permettait une récupération progressive de la disponibilité en oxygène, à 79% de sa valeur basale pour le groupe AD et quasi complète pour le groupe AD-BM (92% de sa valeur basale, figure 2B). Les données de la microdialyse étaient concordantes, elles montraient une relative stabilité de la concentration interstitielle en glucose et du RLP (figure 2C) et l'absence de libération de glutamate reflétées par une augmentation modérée du glucose interstitiel (tableau 1) et une diminution du glutamate (figure 2D).

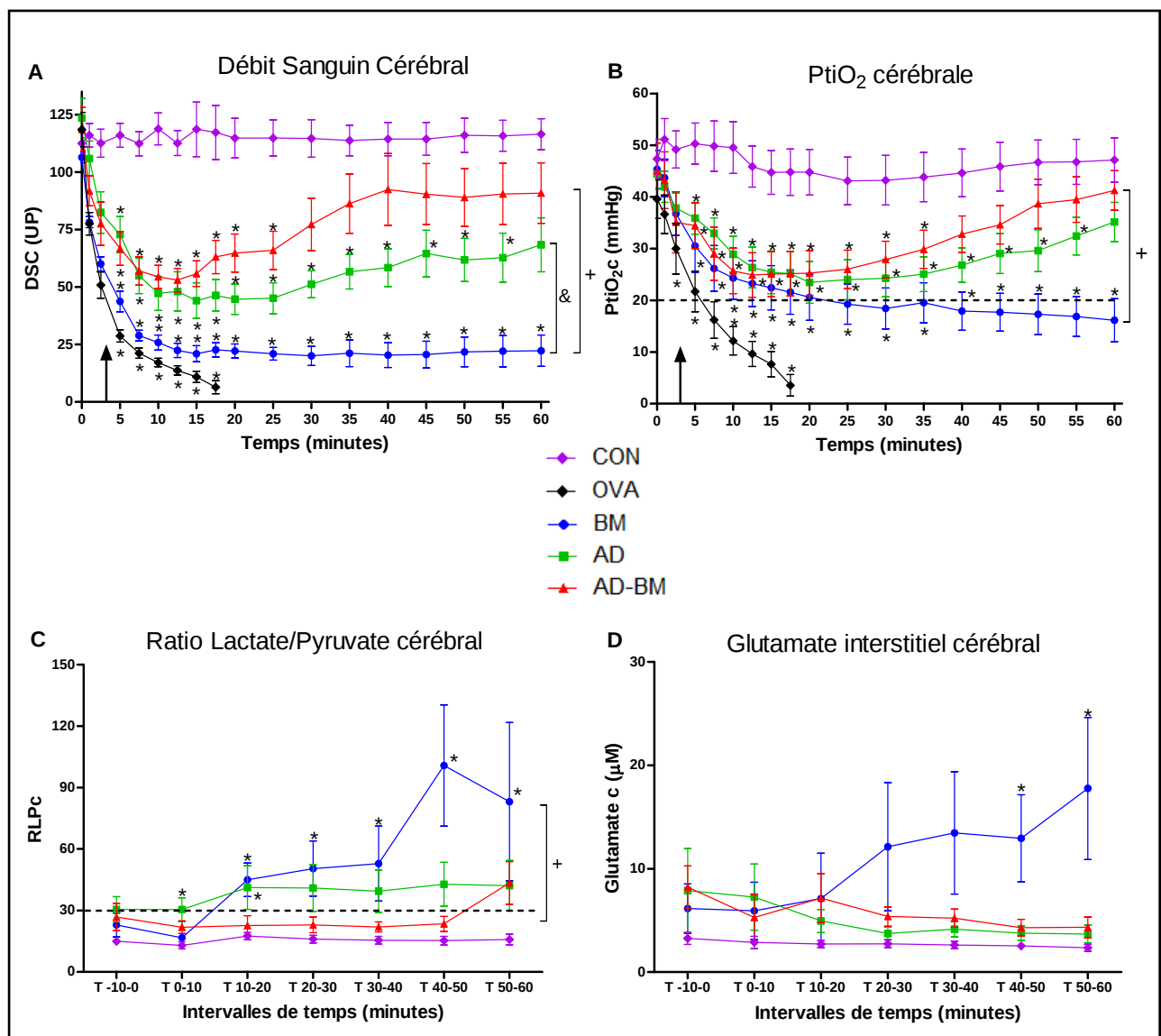


Figure 2. Evolution du débit sanguin cérébral cortical (DSC) (A), de la pression partielle en oxygène dans l'hippocampe (PtiO₂c) (B), du ratio lactate/pyruvate interstitiel (RLPc) (C) et du glutamate interstitiel (Glutamate c) (D) dans le striatum dans les groupes Ovalbumine (OVA), Contrôle (CON), Bleu de Méthylène (BM), Adréaline (AD) et Adréaline associée au Bleu de Méthylène (AD-BM), n = 6 rats par groupe. ↑ correspond au début du traitement, la ligne pointillée représente le seuil ischémique. En raison du débit de microdialyse, les échantillons étaient collectés toutes les 10 minutes à partir de 10 minutes avant l'induction du choc (T0). Comme les rats OVA mourraient dans les 15 premières minutes, les résultats de microdialyse n'ont pas été analysés. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne ± ESM. *p ≤ 0,05 versus le groupe CON, +p ≤ 0,05 différences inter-groupes AD-BM versus BM, &p ≤ 0,05 différences inter-groupes AD versus BM.

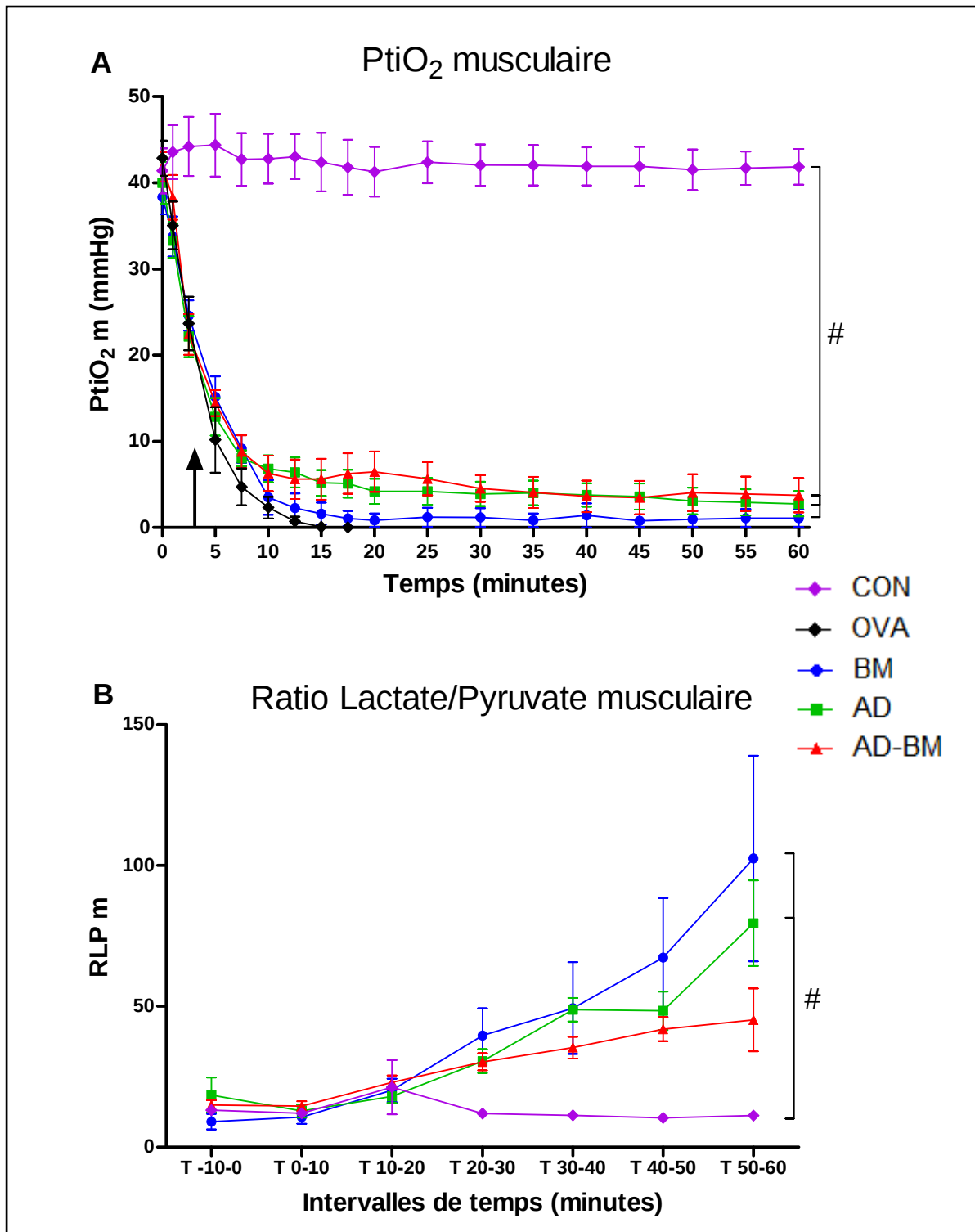


Figure 3. Evolution de la pression partielle en oxygène musculaire (PtiO₂m) (A) et du ratio lactate/pyruvate interstitiel musculaire (RLPc) (B) dans les groupes Ovalbumine (OVA), Contrôle (CON), Bleu de Méthylène (BM), Adrénaline (AD) et Adrénaline associée au Bleu de Méthylène (AD-BM), n=6 rats par groupe. ↑ correspond au début du traitement. En raison du débit de microdialyse, les échantillons étaient collectés toutes les 10 minutes à partir de 10 minutes avant l'induction du choc (T0). Comme les rats OVA mourraient dans les 15 premières minutes, les résultats de microdialyse n'ont pas été analysés. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne ± ESM. #p ≤ 0,05 différences inter-groupes entre les groupes AD-BM ou AD ou BM et le groupe CON.

3.3 Effets des différents traitements sur la physiologie musculaire :

Le profil d'évolution de la PtiO₂ musculaire au cours du temps était similaire entre tous les groupes traités. Sa valeur de base était d'environ 40 mmHg. Après l'induction du choc, une diminution rapide et prolongée de la PtiO₂m était observée, elle se stabilisait finalement à des valeurs basses. Aucun traitement ne permettait de restaurer, même partiellement, la disponibilité en oxygène ; à la 60^{ème} minute elle était à $2.7 \pm 1,5$ mmHg dans le groupe AD, $3,7 \pm 2,0$ mmHg dans le groupe AD-BM et à $1,1 \pm 1,0$ mmHg dans le groupe BM. Il n'existait pas d'effet statistiquement différent entre les différents traitements (figure 3A).

Les concentrations interstitielles de lactate musculaire augmentaient progressivement au cours du temps tandis que celles de pyruvate diminuaient progressivement sans différence statistiquement significative entre les groupes traités (tableau 2). Une augmentation progressive du RLP interstitiel musculaire était observée dans tous les groupes traités. Cette augmentation était significativement plus importante dans les groupes BM et AD par rapport au groupe CON (figure 3B). A la fin de l'expérimentation le RLP était le moins élevé dans le groupe AD-BM mais sans différence statistiquement significative par rapport aux 2 autres groupes traités.

Tableau 2. Evolution des concentrations interstitielles en lactate et en pyruvate au niveau du muscle squelettique (n = 6 rats/groupe).

Molécule	Intervalle de temps (min)	CON	BM	AD	AD-BM
Lactate (mM)	T-10 to T0	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,12	0,69 ± 0,14	1,13 ± 0,17 ^{b,a}
	T0 to T10	0,42 ± 0,03	0,47 ± 0,13	0,63 ± 0,12	0,98 ± 0,16 ^{c,a}
	T10 to T20	0,48 ± 0,05	0,79 ± 0,13	0,92 ± 0,13	1,63 ± 0,22 ^{c,b,a}
	T20 to T30	0,43 ± 0,05	1,20 ± 0,18 ^c	1,64 ± 0,22 ^c	2,13 ± 0,22 ^{c,a}
	T30 to T40	0,47 ± 0,04	1,72 ± 0,29 ^c	2,59 ± 0,41 ^c	2,29 ± 0,25 ^c
	T40 to T50	0,46 ± 0,04	1,91 ± 0,31 ^c	2,35 ± 0,32 ^c	2,26 ± 0,25 ^c
	T50 to T60	0,48 ± 0,04	2,46 ± 0,53 ^c	2,70 ± 0,39 ^c	2,35 ± 0,56 ^c
Pyruvate (mM)	T-10 to T0	0,028 ± 0,003	0,047 ± 0,011	0,056 ± 0,014	0,078 ± 0,012
	T0 to T10	0,036 ± 0,004	0,052 ± 0,013	0,055 ± 0,011	0,070 ± 0,013 ^c
	T10 to T20	0,036 ± 0,010	0,049 ± 0,011	0,056 ± 0,011	0,073 ± 0,010 ^c
	T20 to T30	0,037 ± 0,006	0,043 ± 0,012	0,056 ± 0,007	0,075 ± 0,012 ^c
	T30 to T40	0,043 ± 0,006	0,057 ± 0,021	0,053 ± 0,007	0,068 ± 0,010
	T40 to T50	0,045 ± 0,005	0,043 ± 0,012	0,051 ± 0,008	0,057 ± 0,009
	T50 to T60	0,044 ± 0,004	0,033 ± 0,005	0,041 ± 0,010	0,055 ± 0,007 ^a

L'instant 0 (T0) correspond à l'injection d'ovalbumine. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne ± ESM. ^a*p* ≤ 0,05 vs le groupe BM, ^b*p* ≤ 0,05 vs le groupe AD, ^c*p* ≤ 0,05 vs le groupe CON.

3.4 Evolution des paramètres biochimiques sanguins :

L'évolution au cours du temps des principaux paramètres biochimiques sanguins est résumée dans le tableau 3. Il n'existait pas de différence statistique entre les 5 groupes avant l'induction du choc anaphylactique (T0). Les données concernant le groupe OVA ne sont reportées en raison de la mort de tous les animaux au bout de 15 minutes empêchant le recueil des échantillons et la comparaison avec les autres groupes. 60 minutes après le début du choc, les seules différences statistiquement significatives entre les groupes concernent la PaCO₂, les concentrations plasmatiques en nitrite et nitrate. Quel que soit le traitement, le choc anaphylactique était responsable d'une sévère acidose lactique et d'une hémococoncentration (hémoglobininémie passant de $12,1 \pm 0,3$ à $14,6 \pm 0,4$ g/dL).

Tableau 3. Paramètres biochimiques plasmatiques, gazométriques et acido-basiques (n = 12 rats/groupe).

Paramètres	Temps (min)	CON	BM	AD	AD-BM
pH	T0	$7,44 \pm 0,02$	$7,41 \pm 0,02$	$7,42 \pm 0,01$	$7,42 \pm 0,01$
	T60	$7,44 \pm 0,02$	$7,16 \pm 0,07^{c,d}$	$7,17 \pm 0,04^{c,d}$	$7,09 \pm 0,04^{c,d}$
Pco ₂ (mmHg)	T0	$27,2 \pm 1,7$	$28,5 \pm 1,7$	$29,9 \pm 1,1$	$30,2 \pm 1,2$
	T60	$29,3 \pm 1,4^a$	$17,0 \pm 2,0^{c,d}$	$27,0 \pm 4,0^a$	$31,8 \pm 4,3^a$
Po ₂ (mmHg)	T0	$254,5 \pm 18,3$	$283,3 \pm 19,4$	$294,0 \pm 12,4$	$269,3 \pm 15,3$
	T60	$272,2 \pm 12,0$	$289,5 \pm 39,2$	$287,4 \pm 28,2$	$228,8 \pm 31,1$
HCO ₃ (mmol.L ⁻¹)	T0	$17,8 \pm 0,7$	$18,3 \pm 0,7$	$19,3 \pm 0,5$	$18,9 \pm 0,4$
	T60	$19,4 \pm 0,6$	$7,0 \pm 1,7^{c,d}$	$9,1 \pm 0,7^{c,d}$	$9,2 \pm 1,0^{c,d}$
Lactate (mmol.L ⁻¹)	T0	$2,7 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,2$
	T60	$3,2 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,8^{c,d}$	$7,0 \pm 0,5^{c,d}$	$7,6 \pm 0,7^{c,d}$
Hb (g.dl ⁻¹)	T0	$12,3 \pm 0,4$	$12,1 \pm 0,3$	$12,9 \pm 0,2$	$12,5 \pm 0,2$
	T60	$12,0 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,4^d$	$14,9 \pm 0,5^d$	$15,2 \pm 0,5^d$
Glucose (mmol.L ⁻¹)	T0	$13,6 \pm 0,4$	$12,1 \pm 1,2$	$12,5 \pm 0,7$	$14,2 \pm 1,1$
	T60	$10,1 \pm 0,5$	$11,8 \pm 1,5$	$13,8 \pm 1,6$	$15,7 \pm 2,0^c$
Na (mmol.L ⁻¹)	T0	$137,2 \pm 1,2$	$137,8 \pm 0,9$	$136,4 \pm 0,5$	$136,6 \pm 0,6$
	T60	$137,0 \pm 0,6$	$138,9 \pm 1,9$	$137,9 \pm 1,0$	$131,4 \pm 1,4$
Nitrite (μmol.L ⁻¹)	T60	$2,4 \pm 0,8$	$4,1 \pm 1,4$	$4,1 \pm 0,9$	$8,7 \pm 1,5^{a,b,c}$
Nitrate (μmol.L ⁻¹)	T60	$28,4 \pm 1,7$	$22,4 \pm 2,5^c$	$28,0 \pm 1,6^a$	$31,7 \pm 1,7^a$

L'instant 0 (T0) correspond à l'injection d'ovalbumine. Les résultats sont exprimés tels que : moyenne $\pm$ ESM. Afin d'éviter une spoliation sanguine trop importante avant l'induction du choc, les concentrations de nitrite et de nitrate n'ont été mesurées qu'à la fin de l'expérimentation ^a $p \leq 0,05$ vs le groupe BM, ^b $p \leq 0,05$ vs le groupe AD, ^c $p \leq 0,05$ vs le groupe CON, ^d $p \leq 0,05$ T60 vs T0.

3.5 Expression de la caspase 3 activée et d'HIF-1 α au niveau du cortex cérébral :

60 minutes après l'induction du choc anaphylactique, l'expression de la caspase 3 activée était significativement augmentée au niveau du cortex cérébral dans les groupes BM et AD par rapport au groupe AD-BM. Il n'existait pas de différence significative pour l'expression de cette protéine entre les groupes AD-BM et le groupe contrôle non choqué (figure 4).

Les différences d'expression d'HIF-1 α n'étaient pas significatives entre les 3 groupes traités et le groupe CON. HIF-1 α était surexprimé dans les groupes BM et AD, son expression dans le groupe AD-BM était comparable à celle du groupe CON (figure 4).

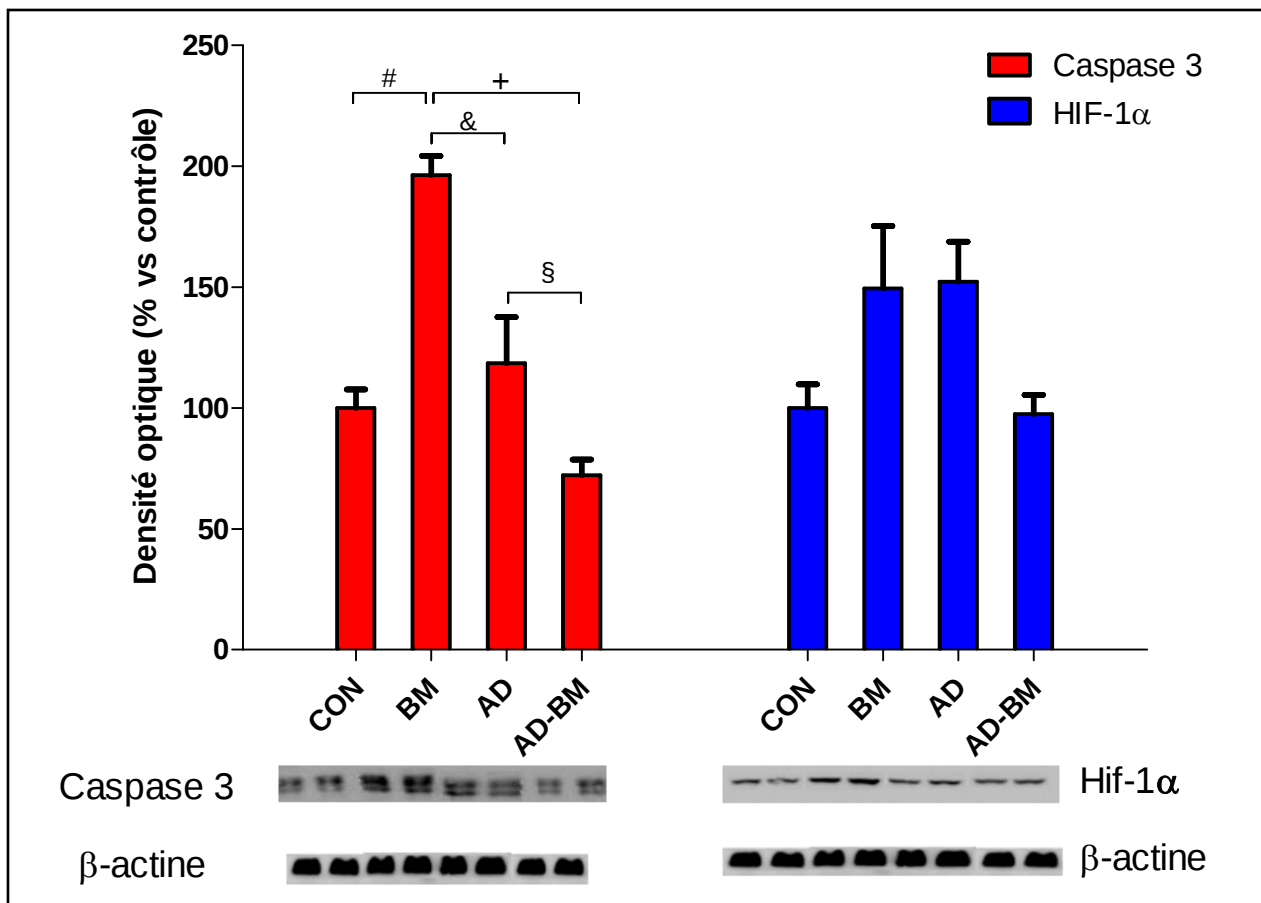


Figure 4. Expression de la caspase 3 activée et d'HIF-1 α au niveau du cortex cérébral dans les groupes Ovalbumine (OVA), Contrôle (CON), Bleu de Méthylène (BM), Adrénaline (AD) et Adrénaline associée au Bleu de Méthylène (AD-BM), n = 6 rats par groupe. Les rats OVA mourraient dans les 15 premières minutes, les tissus n'ont pas été utilisés. ⁺p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD-BM versus BM, [&]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD versus BM, [§]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes AD-BM versus AD, [#]p $\leq$ 0,05 différences inter-groupes BM versus CON.

4. Discussion :

4.1. Résultats principaux :

A notre connaissance, notre travail est le premier décrivant les conséquences hautement délétères du choc anaphylactique sur le cerveau et leurs atténuations par trois différents traitements qui sont utilisés habituellement (adrénaline) ou potentiellement transposables (bleu de méthylène) chez l'homme en cas de CA.

En situation physiologique, la circulation cérébrale est finement régulée afin de fournir un débit sanguin adéquat dans les différentes régions du cerveau [23-26]. Le maintien du débit sanguin cérébral au cours d'une hypotension artérielle, quelle que soit son origine, est essentielle à l'homéostasie de l'organisme et pour la prévention de lésions cérébrales irréversibles. Il est supposé, mais pas démontré, que même dans les états de CA sévères, la perfusion cérébrale est maintenue [12]. En parallèle, une sévère diminution du débit sanguin régional est attendue au niveau du muscle squelettique. Nos résultats démontrent que dans le CA non-traité, la sévère chute du DC empêche toute redistribution de débit sanguin au cerveau, confirmée par la chute du DSC, et entraînant une hypoxie et des perturbations métaboliques cérébrales sévères (fig. 1B, 2A).

Concernant les interventions pharmacologiques pouvant atténuer la diminution du DSC et de ses conséquences cérébrales néfastes, les principaux résultats de notre étude étaient les suivants :

(i) dans ce modèle de CA létal, l'administration de BM seul allongeait la durée de survie, mais n'empêchait pas la constitution de lésions neuronales, attestées par la libération majeure de glutamate. Celle-ci était probablement le résultat de la faible amélioration des paramètres hémodynamiques et de la perfusion tissulaire. Par conséquent, le BM ne peut pas être recommandé en monothérapie.

(ii) L'adrénaline, catécholamine recommandée pour le traitement du CA, restaurait partiellement les paramètres hémodynamiques systémiques et la perfusion cérébrale prévenant ainsi l'excito-toxicité induite par le glutamate.

(iii) L'association AD-BM, exactement comme l'AD seule, évitait l'excito-toxicité neuronale et avait un effet additif sur les variables hémodynamiques et sur la prévention de l'ischémie cérébrale et de l'apoptose neuronale comparée aux traitements administrés individuellement.

(iv) Aucun traitement ne restaurait significativement le DC, ni n'empêchait la survenue de l'ischémie du compartiment musculaire et d'une extravasation microvasculaire.

4.2. Choix, dose, effets du bleu de méthylène :

Une raison fondamentale de l'étude de l'effet du BM dans le CA repose sur le fait que le BM a montré un potentiel effet thérapeutique dans les chocs vasoplégiques réfractaires aux catécholamines associés au sepsis ou au syndrome de réponse inflammatoire systémique survenant dans des contextes cliniques variés, y compris la chirurgie cardiaque [27-29].

De plus, plusieurs cas cliniques rapportés publiés soutiennent l'intérêt clinique de l'utilisation du BM dans le CA.

Dans la plupart des cas, le BM était administré, soit en bolus, soit en perfusion continue en association avec l'AD [15]. Dans notre étude, nous avons administré un bolus unique de 3 mg/kg de BM, une dose similaire aux doses thérapeutiques considérées comme efficaces, non-nocives et utilisées dans d'autres types d'hypotension artérielle réfractaire [30-32]. Bien que

des doses de 5 à 7,5 mg/kg soient habituellement bien tolérées [15], l'utilisation d'une dose de 4 mg/kg maximum a été recommandée [33], la dose létale 50 chez le mouton était estimée à 40 mg/kg [34].

Dans notre étude, un bolus unique de BM améliorait significativement la durée de survie, mais en stabilisant les paramètres hémodynamiques à des valeurs basses par rapport à celles du départ. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par d'autres équipes [18]. Au cours de notre expérimentation, le traitement par BM seul ne prévenait la survenue, ni d'une ischémie cérébrale, attestée par la chute de PtiO₂c, ni de lésions neuronales, démontrées par la libération massive de glutamate (microdialyse in situ). Bien qu'ayant une traduction clinique insuffisante, ces résultats soulignent clairement l'intérêt de la modulation de la voie du NO et de l'utilisation du BM pour le traitement du CA sévère, comme le suggéraient d'autres équipes [18, 35].

4.3. Place du bleu de méthylène dans la modulation de la voie du NO :

Par ailleurs plusieurs études conduites chez différents espèces animales ont confirmé que le NO est un médiateur impliqué de façon importante dans l'anaphylaxie. De bénéfiques à délétères, les effets de la modulation de la voie du NO sur l'état hémodynamique, la dysfonction d'organe et la survie restent cependant incertains.

Les études menées chez la souris ont rapporté des effets bénéfiques après l'administration de N^G-nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME, un inhibiteur non-sélectif des isoformes de la NO synthase) à la fois sur l'hypotension artérielle et la survie [15, 17, 36]. Une étude a démontré l'implication plus particulière de la NO synthase endothéliale dans l'anaphylaxie chez cette espèce [14]. Le BM, quant à lui, ne limitait que partiellement le choc induit par le PAF [14] et ne prévenait pas l'hypotension artérielle du CA à l'ovalbumine [19], suggérant qu'une partie des effets du NO seraient médiés par des mécanismes indépendants de l'activation de la guanylate cyclase soluble (annexe 1).

Les études conduites chez le lapin ont rapporté que l'utilisation de L-NAME entraînait une diminution de la survie par la survenue d'un bronchospasme aggravé et d'une altération plus sévère de la fonction cardiaque [37]. Des résultats similaires étaient observés chez le chien au cours de l'anaphylaxie médiée par les IgE, où le L-NAME corrigeait la vasodilatation et l'hémoconcentration mais n'améliorait pas la fonction cardiaque [38].

Cela avait été aussi rapporté par notre équipe avec le même modèle d'anaphylaxie chez le rat Brown Norway que pour la présente étude. Nous avons montré que l'inhibition non-sélective de la NO synthase (L-NAME) combinée aux blocages des récepteurs à l'histamine et à la sérotonine atténuait l'hypotension artérielle induite par l'ovalbumine mais n'améliorait pas la survie [20]. Dans une autre étude, le 7-nitroindazole, un inhibiteur partiellement sélectif de la NO synthase neuronale atténuait l'hypotension artérielle au cours du CA chez le rat alors que le L-NAME et l'aminoguanidine (inhibiteur partiellement sélectif de la NO synthase inductible) restaient sans effet [39].

Enfin, comme observé dans notre étude présente, une amélioration de la PAM et une survie prolongée étaient rapportées avec l'utilisation du BM au cours de l'anaphylaxie expérimentale chez le lapin [18].

Les différences observées pourraient être dues en partie à des spécificités d'espèce. Il est probable, même si cela reste à démontrer, que l'importance de la dysfonction cardiaque soit différente en fonction des modèles de CA et puisse interférer dans l'interprétation de ces résultats. En extrapolant à partir des modèles expérimentaux de sepsis et des études chez

l'homme, on peut postuler qu'en présence d'une dysfonction myocardique sévère, les inhibiteurs de la NO synthase pourraient diminuer la survie par une altération surajoutée de la fonction ventriculaire droite secondaire à une augmentation de la post-charge ventriculaire droite [40]. D'un point de vue clinique, tous ces résultats n'incitent pas à l'utilisation du BM seul pour le traitement du CA, principalement à cause de son efficacité limitée. Quant aux inhibiteurs spécifiques des isoformes de la NO synthase, ils ne sont pas disponibles pour la pratique clinique.

4.4. Effets de l'adrénaline :

Comme attendu, l'AD, traitement de référence du CA, restaurait partiellement les paramètres hémodynamiques systémiques et la perfusion cérébrale. Ceci permettait de prévenir l'ischémie cérébrale et l'excito-toxicité induite par le glutamate, comme le montraient nos résultats de microdialyse cérébrale. Cependant, l'AD ne permettait pas de normaliser la disponibilité cérébrale en oxygène et n'empêchait pas l'augmentation significative de l'expression de la caspase 3 et la tendance à l'augmentation de celle d'HIF-1 α . Cette augmentation de l'expression d'HIF-1 α n'atteignait pas une significativité statistique probablement en raison du prélèvement des tissus à une phase très précoce dans notre étude [41].

4.5. Effets de l'association bleu de méthylène-adrénaline :

Dans ce modèle d'anaphylaxie létale, un résultat intéressant était l'efficacité significativement supérieure de l'association d'AD et de BM par rapport à l'AD seule. Malgré l'absence de normalisation du débit cardiaque, cette association permettait de restaurer la PAM, le DSC et la disponibilité cérébrale en oxygène. Elle permettait aussi d'éviter l'augmentation du RLP et du glutamate interstitiels cérébraux ainsi que la surexpression de caspase 3 et d'HIF-1 α . Ces résultats soutenaient l'absence d'ischémie cérébrale sévère.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'effet synergique constaté. En dehors des effets hémodynamiques directs respectifs des molécules utilisées, il existe des interactions classiquement décrites entre le NO et les catécholamines. La voie du NO intervient dans l'hyporéactivité vasculaire au cours du choc anaphylactique, de manière indépendante de l'AMPc, en faisant intervenir la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (annexe 2). Il existe un rétrocontrôle entre les catécholamines (via l'AMPc) et la voie du NO. L'AMPc inhibe la NO synthase inductible et la production de NO. Celui-ci diminue quant à lui, la libération et l'activité biologique des catécholamines. L'inhibition non spécifique des NO synthases (NOS) ou de la NOS neuronale (NOSn) augmente la libération des catécholamines au niveau surrénal chez le chien [42-44].

D'autres facteurs, directement liés à l'administration concomitante du BM et de l'AD pourraient être aussi impliqués. Concernant le traitement par BM seul, la discordance, entre l'amélioration de la survie et l'absence de reperfusion tissulaire significative et de correction des anomalies métaboliques pourrait être liée à des effets du BM indépendant de la voie du NO. Après administration systémique, le BM s'accumule rapidement et de façon importante dans le système nerveux [45]. Il a été utilisé comme agent neuroprotecteur dans les encéphalopathies induites par les médicaments, les démences et les troubles maniaco-dépressifs [41, 46, 47]. De plus le BM présentait des propriétés prometteuses de cardio et de neuroprotection dans un modèle expérimental d'arrêt cardiaque. Il était efficace à la fois pour diminuer les conséquences du syndrome d'ischémie-reperfusion et pour augmenter la survie à court-terme après la

récupération d'une activité circulatoire spontanée [48, 49]. Le bleu de méthylène exerce un effet neuroprotecteur par la régulation de l'expression de la guanylate cyclase et par divers processus biologiques allant de l'inhibition de l'apoptose avec la restauration des mécanismes de traduction jusqu'à la reprise du trafic fonctionnel intracellulaire et l'activation de gènes de réparation/régénération cérébrales aussi bien que l'induction de protéines neuroprotectrices essentielles [50].

4.6. Discordance entre la correction de la PAM et du DC :

Un autre résultat important de notre étude concerne la discordance entre la correction de l'hypotension artérielle et la persistance d'un DC très bas après traitement du CA. Les conséquences de cette discordance étaient illustrées par la persistance d'une hypoxie musculaire et cérébrale et par leurs conséquences métaboliques délétères (augmentation du RLP et de la libération de glutamate). Pour la pratique clinique, cette observation suggère qu'en l'absence de monitoring du DC, la correction partielle ou complète de l'hypotension artérielle ne permet pas de présager d'une amélioration parallèle du DC, celui-ci pouvant rester, malgré tout, bas.

A plus forte raison dans les cas de CA réfractaire au traitement conventionnel où la restauration de la PAM est très insuffisante, le DC pourrait rester très bas et exposer les patients à un risque de lésions cérébrales sévères.

Cet état de choc réfractaire pourrait être expliqué, soit par une hypovolémie sévère (démontrée dans notre étude par l'hémoconcentration), une cause possible chez les patients sans cardiopathie préexistante, soit par une dysfonction cardiaque aigüe sévère [4]. L'hypovolémie efficace qui se constitue au cours du choc anaphylactique est entraînée par la vasodilatation et l'extravasation liquidienne (augmentation de la perméabilité vasculaire) induites par les médiateurs de l'anaphylaxie. La dysfonction cardiaque est démontrée chez l'homme et le chien, mais le retentissement est variable et la distinction difficile entre une dysfonction primitive ou secondaire à la chute du retour veineux, à la vasoconstriction pulmonaire et à l'ischémie myocardique [13]. D'autres traitements, en dehors de l'adrénaline, devraient être entrepris dans ces situations.

4.7. Limites de l'étude :

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de variation conséquente des concentrations plasmatiques de nitrite en fonction des différents traitements administrés. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études précédentes. La production de NO a pu être détectée grâce à une électrode spécifique au niveau tissulaire dans un modèle d'anaphylaxie systémique chez le lapin [37], mais pas au niveau plasmatique [18]. L'absence d'augmentation des concentrations plasmatiques en nitrate était également rapportée dans un modèle de CA induit par le composé 48-80 chez le cochon [27]. Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme, chez qui l'augmentation de la production de NO était détectée dans l'air exhalé [51], alors qu'aucune augmentation significative des niveaux de NO n'était détectée dans le plasma [52]. L'ensemble de ces données suggèrent que la production de NO peut être mesurée au niveau tissulaire mais pas au niveau plasmatique.

Une autre limite potentielle est l'absence d'expansion volémique à proprement parler. Elle se limitait à l'injection d'un bolus d'1 ml de sérum physiologique suivie d'une perfusion continue à $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nous avons choisi de ne pas réaliser d'expansion volémique massive afin de ne pas interférer sur l'étude de l'effet propre de chacun des différents traitements et pour ne pas avoir à multiplier le nombre de groupes.

D'autres études sont nécessaires pour identifier les mécanismes expliquant les effets bénéfiques potentiels de l'association AD-BM. Bien que le recours au BM dans les cas de CA réfractaires au traitement conventionnel ne puisse pas être recommandé formellement, son utilisation pourrait être reconsidérée dans certaines situations critiques.

4.8. Perspectives :

L'expansion volémique en association à l'adrénaline est le traitement recommandé du choc anaphylactique [1]. D'autres études sont nécessaires pour juger de la persistance de l'effet bénéfique additif du BM lorsqu'on l'associe à une expansion volémique.

Le type de soluté de remplissage pourrait avoir aussi un impact sur l'efficacité de la réanimation de ce choc. Cette question a fait l'objet d'un autre travail (en cours de publication) de notre équipe, avec le même modèle léthal de choc anaphylactique que pour cette étude. Les animaux étaient randomisés en cinq groupes : un groupe non-traité, un autre recevant de l'adrénaline sans remplissage vasculaire, un autre de l'adrénaline et du sérum salé isotonique, un autre de l'adrénaline et de l'hydroxyethylamidon et le dernier de l'adrénaline avec l'association hydroxyethylamidon-sérum salé hypertonique. Nous avons conclu que la solution d'hydroxyethylamidon était le soluté le plus efficace en association avec l'adrénaline pour restaurer le débit cardiaque et le seul permettant de restaurer la disponibilité en oxygène et de préserver le métabolisme aérobie au niveau d'un compartiment adaptatif (le muscle squelettique). L'association hydroxyethylamidon-sérum salé hypertonique, malgré sa durée d'administration la plus courte et son fort pouvoir osmotique (pouvant potentiellement contrecarrer l'extravasation liquidienne massive) ne montrait qu'une efficacité très relative, probablement liée au faible volume administré et à l'augmentation de la perméabilité capillaire.

L'expansion volémique n'est qu'un traitement symptomatique de l'hypovolémie efficace, l'évaluation de traitements spécifiques visant à corriger l'hyperperméabilité capillaire pourrait être intéressante, en ciblant les aquaporines par exemple [53].

Dans l'optique de prolonger la survie et ainsi d'évaluer les effets des traitements à plus long terme sur les organes nobles, une autre perspective de ce travail serait d'améliorer le traitement du choc anaphylactique en associant l'expansion volémique (sérum salé isotonique ou hydroxyethylamidon) à un vasoconstricteur (adrénaline, vasopressine) et à un agent pharmacologique inhibant les conséquences des cascades d'activation cellulaires induites par les médiateurs de l'anaphylaxie (inhibiteur des tyrosines kinases [14, 54] ou du PAF [55] ou des récepteurs à l'histamine [55, 56]).

Chez la souris non anesthésiée, le choc induit par l'administration de PAF dépend de la production de NO par la NOSe phosphorylée et non pas par la NOSi. La NOSe peut être activé directement par phosphorylation, sans liaison du complexe calcium-calmoduline, par la voie PI3K/Akt. Cette voie est activée par des tyrosines kinases, des protéines G couplées aux récepteurs ou par des forces mécaniques (shear stress). La même équipe a démontré, toujours chez la souris non anesthésiée, avec un modèle de choc anaphylactique par sensibilisation au BSA ou à l'ovalbumine, la même implication de la NOSe et de PI3K, au niveau de différents paramètres : l'hypotension artérielle, l'hypothermie et la perméabilité vasculaire induites par le choc. Dans ce modèle de choc anaphylactique, les auteurs ont démontré l'implication supplémentaire d'Akt. Une fois activé, PI3K génère du phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3), responsable du recrutement et de l'activation d'Akt (protéine kinase B), lui-même activant plusieurs voies de transduction du signal dont la NOSe [14].

5. Conclusion :

Nos résultats suggèrent que l'association bleu de méthylène-adrénaline, mais pas le bleu de méthylène en monothérapie pourrait avoir des effets bénéfiques dans le choc anaphylactique sévère. Seule l'association bleu de méthylène-adrénaline permettait de prévenir l'apoptose neuronale. Les mécanismes responsables de ces effets restent à identifier. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats en y associant l'expansion volémique.

Par ailleurs, concernant la prise en charge thérapeutique du choc anaphylactique, la dissociation entre la correction de la pression artérielle moyenne et le maintien d'un débit cardiaque très bas expose le sujet à un risque persistant d'hypoperfusion systémique et neurologique. En effet, malgré les mécanismes d'autorégulation du débit sanguin cérébral, l'ischémie, l'hypoxie et les dysfonctionnements métaboliques cérébraux sont aussi des caractéristiques majeures du choc anaphylactique.

Bibliographie :

1. Mertes PM, Laxenaire MC, Lienhart A, Aberer W, Ring J, Pichler WJ, et al. Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia: guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005; 15(2): 91-101.
2. Currie M, Webb RK, Williamson JA, Russell WJ, Mackay P. The Australian Incident Monitoring Study. Clinical anaphylaxis: an analysis of 2000 incident reports. *Anaesthesia and intensive care*. 1993; 21(5): 621-5.
3. Mitsuhashi H, Matsumoto S, Hasegawa J. [The epidemiology and clinical features of anaphylactic and anaphylactoid reactions in the perioperative period in Japan]. *Masui The Japanese journal of anesthesiology*. 1992; 41(10): 1664-9.
4. Brown SG. Cardiovascular aspects of anaphylaxis: implications for treatment and diagnosis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005; 5(4): 359-64.
5. Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002; 110(3): 341-8.
6. Correa E, Mink S, Unruh H, Kepron W. Left ventricular contractility is depressed in IgE-mediated anaphylactic shock in dogs. *The American journal of physiology*. 1991; 260(3 Pt 2): H744-51.
7. Cui S, Shibamoto T, Zhang W, Takano H, Kurata Y. Venous resistance increases during rat anaphylactic shock. *Shock*. 2008; 29(6): 733-9.
8. Dewachter P, Jouan-Hureau V, Franck P, Menu P, de Talance N, Zannad F, et al. Anaphylactic shock: a form of distributive shock without inhibition of oxygen consumption. *Anesthesiology*. 2005; 103(1): 40-9.
9. Karasawa N, Shibamoto T, Cui S, Takano H, Kurata Y, Tsuchida H. Hepatic pre-sinusoidal vessels contract in anaphylactic hypotension in rabbits. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007; 189(1): 15-22.
10. Liu W, Takano H, Shibamoto T, Cui S, Zhao ZS, Zhang W, et al. Involvement of splanchnic vascular bed in anaphylactic hypotension in anesthetized BALB/c mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007; 293(5): R1947-53.
11. Miyahara T, Shibamoto T, Wang HG, Koyama S. Role of circulating blood components and thromboxane in anaphylactic vasoconstriction in isolated canine lungs. *J Appl Physiol*. 1997; 83(5): 1508-16.
12. Czosnyka M, Brady K, Reinhard M, Smielewski P, Steiner LA. Monitoring of cerebrovascular autoregulation: facts, myths, and missing links. *Neurocritical care*. 2009; 10(3): 373-86.
13. Brown SG. Anaphylaxis: clinical concepts and research priorities. *Emergency medicine Australasia : EMA*. 2006; 18(2): 155-69.
14. Cauwels A, Janssen B, Buys E, Sips P, Brouckaert P. Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116(8): 2244-51.

15. Evora PR, Simon MR. Role of nitric oxide production in anaphylaxis and its relevance for the treatment of anaphylactic hypotension with methylene blue. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2007; 99(4): 306-13.
16. Joe EK, Schussheim AE, Longrois D, Maki T, Kelly RA, Smith TW, et al. Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998; 30(2): 303-15.
17. Amir S, English AM. An inhibitor of nitric oxide production, NG-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock. *European journal of pharmacology*. 1991; 203(1): 125-7.
18. Buzato MA, Viaro F, Piccinato CE, Evora PR. The use of methylene blue in the treatment of anaphylactic shock induced by compound 48/80: experimental studies in rabbits. *Shock*. 2005; 23(6): 582-7.
19. Takano H, Liu W, Zhao Z, Cui S, Zhang W, Shibamoto T. N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, but not methylene blue, attenuates anaphylactic hypotension in anesthetized mice. *Journal of pharmacological sciences*. 2007; 104(3): 212-7.
20. Bellou A, Lambert H, Gillois P, Montemont C, Gerard P, Vauthier E, et al. Constitutive nitric oxide synthase inhibition combined with histamine and serotonin receptor blockade improves the initial ovalbumin-induced arterial hypotension but decreases the survival time in brown norway rats anaphylactic shock. *Shock*. 2003; 19(1): 71-8.
21. Albe-Fessard D, Stutinsky F, Libouban S. Atlas stéréotaxique du diencephale du rat blanc. 2. éd. revue et corr. ed. Paris,: Centre national de la recherche scientifique; 1971.
22. Dewachter P, Raeth-Fries I, Jouan-Hureau V, Menu P, Vigneron C, Longrois D, et al. A comparison of epinephrine only, arginine vasopressin only, and epinephrine followed by arginine vasopressin on the survival rate in a rat model of anaphylactic shock. *Anesthesiology*. 2007; 106(5): 977-83.
23. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM, Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 2006; 100(1): 318-27.
24. Buerk DG, Ances BM, Greenberg JH, Detre JA. Temporal dynamics of brain tissue nitric oxide during functional forepaw stimulation in rats. *NeuroImage*. 2003; 18(1): 1-9.
25. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2004; 5(5): 347-60.
26. Rosengarten B, Wolff S, Klatt S, Schermuly RT. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition or norepinephrine on the neurovascular coupling in an endotoxic rat shock model. *Crit Care*. 2009; 13(4): R139.
27. Evora PR, Viaro F. The guanylyl cyclase inhibition by MB as vasoplegic circulatory shock therapeutical target. *Current drug targets*. 2006; 7(9): 1195-204.
28. Levin RL, Degrange MA, Bruno GF, Del Mazo CD, Taborda DJ, Griotti JJ, et al. Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery*. 2004; 77(2): 496-9.

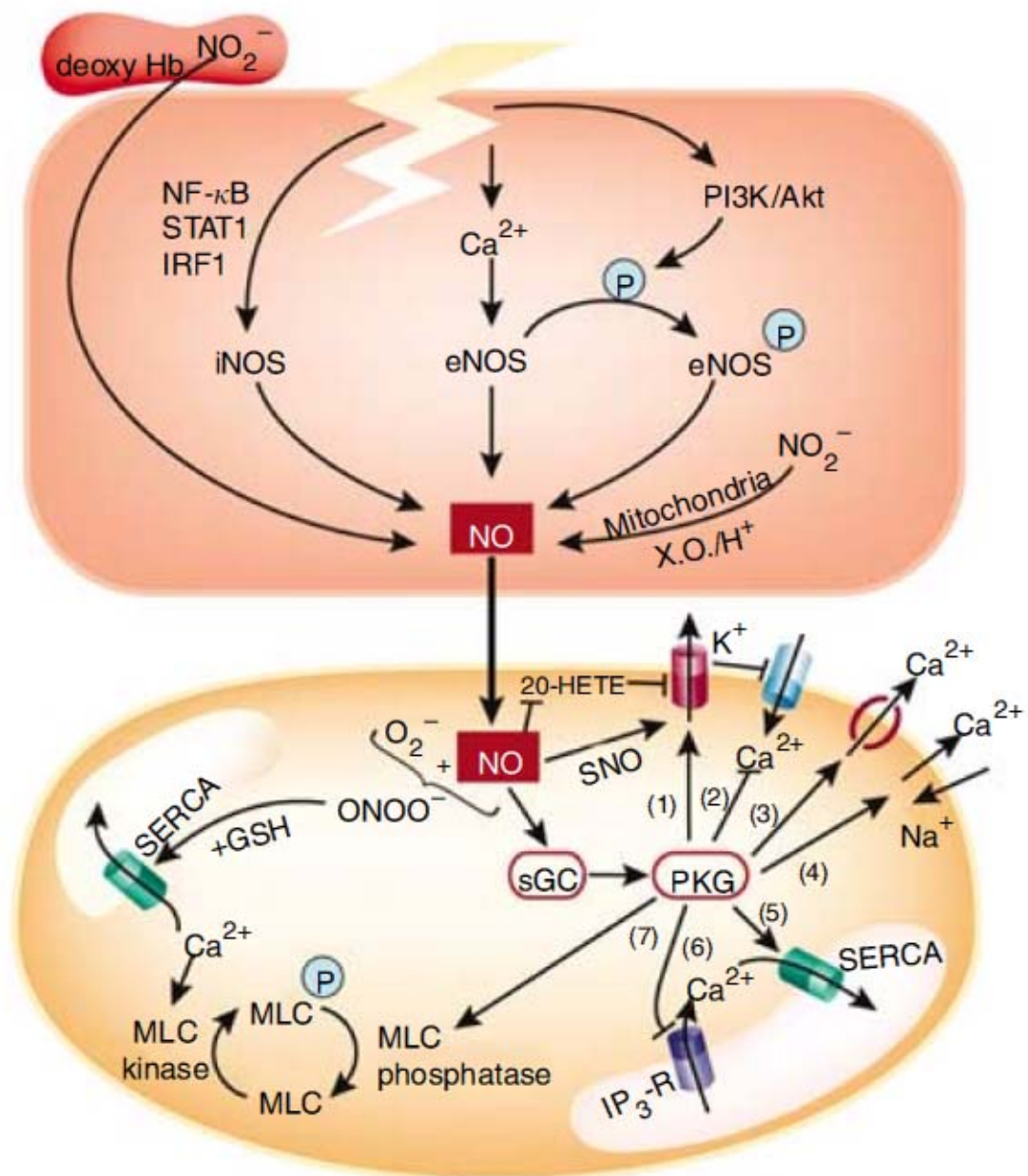
29. Mora-Ordóñez JM, Sánchez-Llorente F, Galeas-López JL, Hernández Sierra B, Prieto-Palomino MA, Vera-Almazán A. [Use of methylene blue in the treatment of vasoplegic syndrome of post-operative heart surgery]. *Medicina intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias*. 2006; 30(6): 293-6.
30. Donati A, Conti G, Loggi S, Munch C, Coltrinari R, Pelaia P, et al. Does methylene blue administration to septic shock patients affect vascular permeability and blood volume? *Critical care medicine*. 2002; 30(10): 2271-7.
31. Maslow AD, Stearns G, Butala P, Schwartz CS, Gough J, Singh AK. The hemodynamic effects of methylene blue when administered at the onset of cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia*. 2006; 103(1): 2-8, table of contents.
32. Sparicio D, Landoni G, Zangrillo A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors predispose to hypotension refractory to norepinephrine but responsive to methylene blue. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004; 127(2): 608.
33. Martindale SJ, Stedeford JC. Neurological sequelae following methylene blue injection for parathyroidectomy. *Anaesthesia*. 2003; 58(10): 1041-2.
34. Burrows GE. Methylene blue: effects and disposition in sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 1984; 7(3): 225-31.
35. Menardi AC, Capellini VK, Celotto AC, Albuquerque AA, Viaro F, Vicente WV, et al. Methylene blue administration in the compound 48/80-induced anaphylactic shock: hemodynamic study in pigs. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2011; 26(6): 481-9.
36. Osada S, Ichiki H, Oku H, Ishiguro K, Kunitomo M, Semma M. Participation of nitric oxide in mouse anaphylactic hypotension. *European journal of pharmacology*. 1994; 252(3): 347-50.
37. Mitsuhashi H, Saitoh J, Hasome N, Takeuchi H, Horiguchi Y, Shimizu R. Nitric oxide synthase inhibition is detrimental to cardiac function and promotes bronchospasm in anaphylaxis in rabbits. *Shock*. 1995; 4(2): 143-8.
38. Mitsuhashi H, Takeuchi H, Saitoh J, Hasome N, Horiguchi Y, Shimizu R. An inhibitor of nitric oxide synthase, N omega-nitro-L-arginine-methyl ester, attenuates hypotension but does not improve cardiac depression in anaphylaxis in dogs. *Shock*. 1995; 3(6): 447-53; discussion 54.
39. Zhang W, Shibamoto T, Cui S, Takano H, Kurata Y. 7-nitroindazole, but not L-NAME or aminoguanidine, attenuates anaphylactic hypotension in conscious rats. *Shock*. 2009; 31(2): 201-6.
40. Ndrepepa G, Schomig A, Kastrati A. Lack of benefit from nitric oxide synthase inhibition in patients with cardiogenic shock: looking for the reasons. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007; 297(15): 1711-3.
41. Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother*. 2002; 14(5): 431-43.
42. Barnes RD, Ward LE, Frank KP, Tyce GM, Hunter LW, Rorie DK. Nitric oxide modulates evoked catecholamine release from canine adrenal medulla. *Neuroscience*. 2001; 104(4): 1165-73.

43. Kolo LL, Westfall TC, Macarthur H. Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004; 286(1): H296-303.
44. Ward LE, Hunter LW, Grabau CE, Tyce GM, Rorie DK. Nitric oxide reduces basal efflux of catecholamines from perfused dog adrenal glands. *Journal of the autonomic nervous system*. 1996; 61(3): 235-42.
45. Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *European journal of clinical pharmacology*. 2000; 56(3): 247-50.
46. Kupfer A, Aeschlimann C, Cerny T. Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy. *European journal of clinical pharmacology*. 1996; 50(4): 249-52.
47. Naylor GJ, Martin B, Hopwood SE, Watson Y. A two-year double-blind crossover trial of the prophylactic effect of methylene blue in manic-depressive psychosis. *Biological psychiatry*. 1986; 21(10): 915-20.
48. Miculescu A, Basu S, Wiklund L. Cardio-cerebral and metabolic effects of methylene blue in hypertonic sodium lactate during experimental cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2007; 75(1): 88-97.
49. Wiklund L, Basu S, Miculescu A, Wiklund P, Ronquist G, Sharma HS. Neuro- and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1122: 231-44.
50. Martijn C, Wiklund L. Effect of methylene blue on the genomic response to reperfusion injury induced by cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in porcine brain. *BMC medical genomics*. 2010; 3: 27.
51. Rolla G, Nebiolo F, Guida G, Heffler E, Bommarito L, Bergia R. Level of exhaled nitric oxide during human anaphylaxis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2006; 97(2): 264-5.
52. Gupta A, Lin RY, Pesola GR, Bakalchuk L, Curry A, Lee H-s, et al. Nitric Oxide Levels in Patients with Acute Allergic Reactions. *Internet Journal of Asthma, Allergy and Immunology*. 2003; 3(1).
53. Wang W, Zheng M. Nuclear factor kappa B pathway down-regulates aquaporin 5 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011; 268(1): 73-81.
54. Kang NI, Yoon HY, Kim HA, Kim KJ, Han MK, Lee YR, et al. Protein kinase CK2/PTEN pathway plays a key role in platelet-activating factor-mediated murine anaphylactic shock. *J Immunol*. 2011; 186(11): 6625-32.
55. Arias K, Baig M, Colangelo M, Chu D, Walker T, Goncharova S, et al. Concurrent blockade of platelet-activating factor and histamine prevents life-threatening peanut-induced anaphylactic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009; 124(2): 307-14, 14 e1-2.
56. Chrusch C, Sharma S, Unruh H, Bautista E, Duke K, Becker A, et al. Histamine H3 receptor blockade improves cardiac function in canine anaphylaxis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999; 160(4): 1142-9.

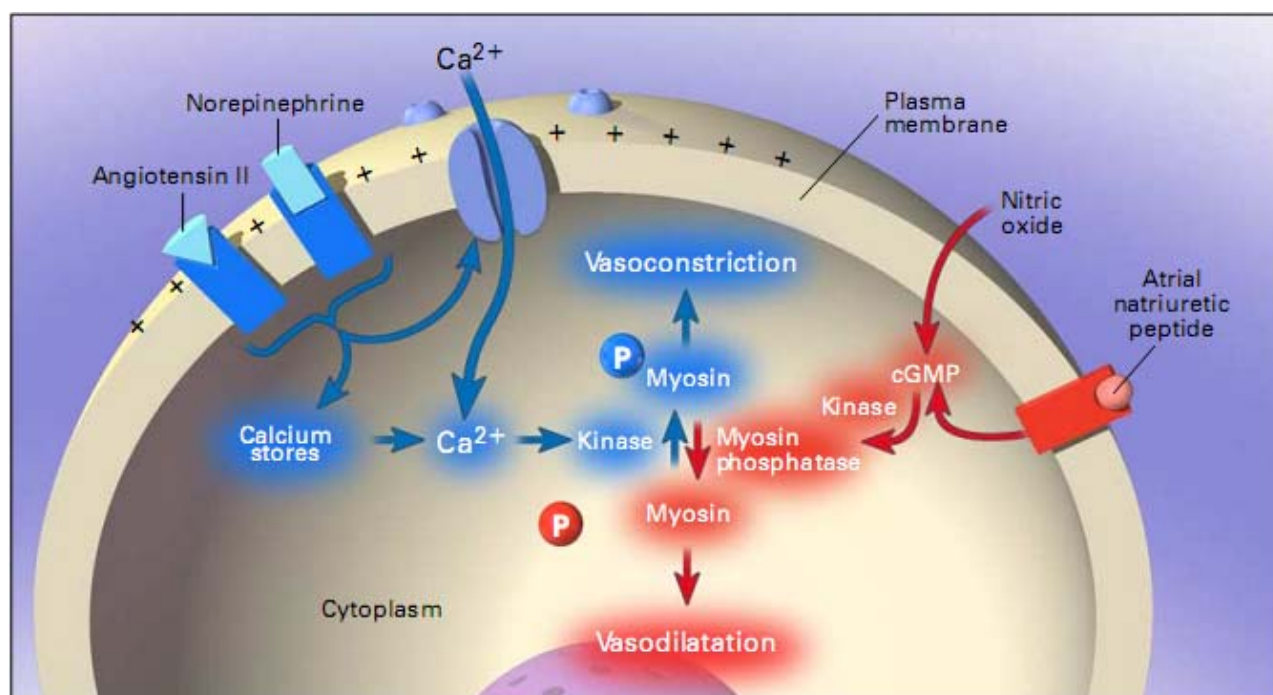
57. Abraham MA, Hesketh RP. Reaction engineering for pollution prevention. 1st ed. Amsterdam ; New York: Elsevier; 2000.
58. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. The New England journal of medicine. 2001; 345(8): 588-95.

Annexes :

Annexe 1 : Schéma des différents mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la vasorelaxation induite par le NO [57].



Annexe 2 : Schéma général des voies de signalisation des catécholamines et du NO pour la régulation de la contractilité la cellule musculaire lisse [58].



VU

NANCY, le **28 septembre 2012**

Le Président de Thèse

NANCY, le **28 septembre 2012**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur P-M. MERTES

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE 5041

NANCY, le 5 octobre 2012

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE :

CONTEXTE : L'hypotension sévère au cours du choc anaphylactique (CA) peut être réfractaire à l'adrénaline (AD) et compromettre l'oxygénation et le métabolisme cérébraux et ainsi contribuer à la morbi-mortalité de cette pathologie. Cet état réfractaire à l'AD pourrait être corrigé par les inhibiteurs de la voie du NO comme le bleu de méthylène (BM). L'objectif de ce travail était de comparer les effets systémiques et régionaux (muscle et cerveau) de l'AD et du BM, administrés seuls ou en association dans un modèle murin de CA.

MATÉRIEL ET MÉTHODE : Après sensibilisation à l'ovalbumine (OVA), un choc anaphylactique était induit par injection intraveineuse. Les animaux (n=60) recevaient, soit du sérum physiologique (groupe OVA), soit 3 mg/kg de bleu de méthylène en bolus (groupe BM), soit de l'adrénaline (groupe AD), soit l'association des deux traitements (groupe AD-BM). Des rats contrôles ne recevaient pas d'OVA (groupe CON). La pression artérielle moyenne (PAM), le débit cardiaque (DC), le débit sanguin cérébral (DSC), la pression partielle en oxygène musculaire (P_{tiO_2m}) et cérébrale (P_{tiO_2c}) et le ratio lactate/pyruvate interstitiel musculaire (RLPm) et cérébral (RLPc) étaient mesurés. L'expression de la caspase 3 activée et d'HIF-1 α était mesurée dans le cortex cérébral par western-blot.

RÉSULTATS : Sans traitement, les rats mourraient au bout de 15 minutes d'une chute sévère du DC et de la PAM, alors que les rats traités survivaient jusqu'à la fin de l'expérimentation. Le BM seul, augmentait la durée de survie, mais sans restaurer l'état hémodynamique, ni la perfusion tissulaire et sans prévenir la souffrance neuronale. L'AD restaurait partiellement l'état hémodynamique et la perfusion cérébrale prévenant l'excito-toxicité induite par le glutamate. Par rapport à l'AD seule, l'association AD-BM évitait l'excito-toxicité neuronale et avait un effet additif à la fois sur les paramètres hémodynamiques et pour la prévention de l'ischémie cérébrale. Aucun traitement ne restaurait significativement le DC, ni n'empêchait l'ischémie musculaire et l'extravasation capillaire.

CONCLUSION: Le CA induit de sévères perturbations du DSC malgré la correction de l'hypotension artérielle. L'AD doit être encore considérée comme l'agent vasoconstricteur de première intention pour le traitement du choc anaphylactique. L'association AD-BM était le traitement le plus efficace pour prévenir l'ischémie cérébrale et pourrait être utile dans les CA réfractaires à l'AD.

TITRE EN ANGLAIS : METHYLENE BLUE AND EPINEPHRINE, A SYNERGETIC ASSOCIATION FOR ANAPHYLACTIC SHOCK TREATMENT.

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – 2012

MOTS-CLEFS : bleu de méthylène, adrénaline, monoxyde d'azote, anaphylaxie, microdialyse, circulation cérébrale, ischémie.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY cedex