

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Biologie Systémique Médicale

Par

Antoine Persello

Évaluation du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs du complexe phosphatase PP1c/PPP1R15A sur la réponse intégrée au stress au cours d'une circulation extracorporelle.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 19 juillet 2021

Unité de recherche : Université de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

Rapporteurs avant soutenance :

Paul-Michel Mertes
Fabienne Fougelle

Professeur des universités – Praticien hospitalier - Strasbourg
Directeur de recherche INSERM - Centre de recherche des Cordeliers Inserm UMRS 1138

Composition du Jury :

Président : Anne Claire Lukaszewicz Professeur des universités – Praticien hospitalier – Hospices civiles de Lyon

Examineurs : Paul-Michel Mertes Professeur des universités – Praticien hospitalier – NHC- Strasbourg
Fabienne Fougelle Directeur de recherche INSERM-CRC - Inserm - UMRS 1138
Anne Claire Lukaszewicz Professeur des universités – Praticien hospitalier – Hospices civiles de Lyon

Dir. de thèse : Bertrand Rozec Professeur des universités – Praticien hospitalier – CHU Nantes
Co-dir. de thèse : Benjamin Lauzier Maître de Conférences Universitaires, INSERM, HDR, Université de Nantes

Invité(s)

Encadrant de thèse : Emmanuelle Abgueuen PhD, InFlectis BioScience, Nantes

Cette thèse CIFRE a été réalisée en collaboration entre InFlectis BioScience et l'équipe IIB -
Heart failure and pharmacological approaches – de l'institut du thorax, INSERM UMR 1087/
CNRS UMR 6291

Remerciements

Il est difficile de résumer ces 3 ans et demi de thèse par de simples mots. Ces années ont été remplies de réussites et d'échecs ainsi que de frustrations et d'accomplissements. Ces années ont été une opportunité d'apprendre autant sur le vaste monde de la recherche que sur le plan personnel.

Même s'il reste tant à comprendre et à découvrir, une certitude s'impose : rien de tout cela n'aurait été possible seul. Je dédie donc ces quelques prochaines pages aux personnes qui ont permis cela ou participé d'une façon ou d'une autre à ce travail.

Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Paul Michel Mertes et le Dr. Fabienne Fougelle d'avoir accepté à assister et d'être rapporteurs pour cette thèse. Je souhaite remercier également le Pr. Anne-Claire Lukaszewicz d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer les travaux de cette thèse.

Je souhaite remercier également le Pr. Antoine Roquilly et le Dr. Sandrine Horman d'avoir participer à mon comité de suivi de thèse, de m'avoir conseillé et pour les discussions enrichissantes que l'on a eues.

Enfin, je souhaite remercier le Dr. Benjamin Lauzier, le Pr Bertrand Rozec et le Dr. Emmanuelle Abgueguen d'avoir dirigé et encadré ma thèse,

Je remercie Chantal et Michel de m'avoir accueilli dans l'équipe beta 3 puis IIb depuis les années de master. Merci pour vos conseils, pour votre temps, pour votre écoute et pour votre confiance.

Je remercie mes collègues à InFlectis BioScience, Philippe, Emmanuelle, Pierre, Caroline, Rozenn et Pauline pour m'avoir accueilli au sein d'InFlectis BioScience. Je regrette de ne pas avoir pu passer plus de temps avec vous durant cette thèse. Je remercie Emmanuelle, Pierre et Philippe. Merci pour le temps accordé, pour les conseils et pour les corrections que vous m'avez tous apporté. Merci de m'avoir appris ce qu'est la recherche en industrie, de m'avoir permis d'en apprendre plus sur les essais cliniques, le développement des molécules, la propriété intellectuelle. Merci surtout de m'avoir fait confiance pour cette thèse et pour l'opportunité que cela a représenté.

Je tiens à remercier Benjamin, Bertrand et Emmanuelle pour l'aide que vous m'avez toujours accordé, pour votre patience. Merci pour votre investissement et confiance qui m'a toujours, je pense, poussé dans la bonne direction. Je vous remercie pour toutes ces conversations et les conseils avisé que vous m'avez donné.

Je te remercie Emmanuelle pour ta patience, ton écoute et ta bienveillance. Merci pour tous les conseils, j'en ai pris bonne note, même pour les plus évident, comme éviter de citer Wikipédia en référence (ce qui n'était pas prévu mais j'ai noté). Merci pour les discussions plus ou moins scientifiques et pour m'avoir rappelé plusieurs fois, surtout ces dernières semaines, que dormir parfois c'est bien aussi ! Merci pour les chocolats également que tu m'as toujours proposé lors de mes passages outre Loire !

Merci à toi Bertrand pour le temps que tu as toujours libéré pour moi, pour les corrections de présentations, de manuscrits. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec la clinique et d'avoir fait l'intermédiaire pour faciliter cela. Merci pour ton enthousiasme, pour la tonne de connaissance mais surtout cette passion que tu as su me transmettre pour la réa. Merci de m'avoir fourni tant de conseils et d'avoir répondu à mes questions, parfois surement pas très claires ! Merci d'avoir su me booster lorsque la motivation retombait ! Merci pour tous les moments au laboratoire mais aussi à l'extérieur, pour toutes ces discussions que l'on a eues autour de cafés ou de bières ou autour des, je pense, centaines de M&M's consommés.

Je tiens à te remercier Ben pour beaucoup de choses. La première et la plus importante est la confiance que tu m'as accordé dès le Master 1 et que tu as continué à placer en moi par la suite. Je doute que beaucoup d'encadrants auraient pris les « risques » et le temps que tu as pris pour me garder durant les stages et la thèse, et pour ça je t'en suis infiniment reconnaissant. Je te remercie de m'avoir offert des conseils avisés et consacré du temps. Merci pour m'avoir transmis tant de connaissances. Merci pour l'énergie infailible et la bonne humeur que tu mets dans l'encadrement, les lectures et relectures de diapos, abstracts ou autres manuscrits, et ce malgré des virgules innombrables et mal placées. Merci pour m'avoir permis d'évoluer en autonomie avec un filet de sécurité, pour m'avoir permis d'encadrer un nombre (incalculable !) d'étudiants et d'enseigner. Enfin, au-delà de l'encadrant, je ne peux pas ne pas te remercier d'être aussi un ami qui est à l'écoute, qui a su me remotiver lorsque le moral tombait. Merci pour les soirées à « réseauter » autour d'un verre, les restau, les soirées à jouer, le Hellfest et dernièrement pour m'avoir fait découvrir la voile. Merci.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe IIb à l'institut du thorax. Un grand merci à Chantal qui a su être de grand-conseil durant les années de Master. Un grand merci à Michel DW pour ses relectures d'articles, pour ses conseils, pour son implication dans la recherche et dans l'équipe. Je remercie également son homonyme de l'équipe, Michel R, pour sa bonne humeur et le recul qu'il sait apporter aux présentations en réunion, ainsi que ses conseils expérimentaux. Merci à Marja, pour toutes les corrections d'abstracts, ton aide à la rédaction en anglais, et d'avoir su partager ton recul sur transcriptomique. Je te remercie également pour la patience dont tu as fait preuve chaque jour à écouter nos blagues et nos digressions dans le bureau ! Merci aux experts du patch auto, Jérôme, Sébastien, Barbara et Ludivine, pour la bonne humeur que vous amenez au laboratoire. Merci à toi Jérôme de m'avoir introduit à R, de m'avoir toujours accordé du temps faut m'expliquer la transcriptomique, la protéomique, les analyses, les statistiques et beaucoup d'autres choses. Merci pour ta bonne humeur.

Je remercie mes prédécesseurs Valentine et Marine de m'avoir aidé pour mes rédactions, mes présentations. Merci à toi Marine pour le temps que tu nous as accordé en master 2, pour tes innombrables conseils. Merci à Morteza d'avoir été présent et d'avoir pu apporter un soutien et des conseils. Merci pour l'aide que tu m'as apporté durant le M2, et pour les quelques heures de manip que nous avons faites ensemble.

Je remercie Virginie pour avoir été un soutien essentiel pour les chirurgies, l'histologie et pour toute l'implication que tu as mise dans le projet. Mais merci surtout pour ta bonne humeur, tes blagues et ton rire qui remonte le moral instantanément ! Ces longues heures en chirurgies auraient été extrêmement pénible sans ton appui ! Je te remercie Angélique de m'avoir appris toutes les ficelles et les astuces du Western Blot et de la PCR et en général de la pratique en laboratoire. Merci pour ta patience, que j'ai dû parfois éprouver, et ce depuis le M1. Il est évident que tu m'as permis d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et propres et que c'est à toi que je dois la rigueur expérimentale qui m'a permis d'avancer dans ma thèse. Merci pour tout. Merci aussi à Anaïs pour ta bonne humeur et ton humour à toute épreuve, il convient parfaitement à celui de l'équipe ! Tes moments de poisses m'auront bien fait sourire ! Merci pour les coups de mains précieux que tu m'auras filés !

Je te remercie Justine merci pour ta bonne humeur, pour les nombreux moments passés depuis le M1 que ce soit en cours, en congrès, au laboratoire, lors des pauses café et j'en passe. Merci d'avoir supporté nos blagues dans le bureau sans trop sourciller et pour l'aide que tu as su apporter durant ces années ! Je te souhaite le meilleur pour la suite ! Merci à Ludivine, pour les pauses-café, les soirées, les repas bien mérités après l'escalade ! Merci pour ta bonne humeur communicative et ton accent rafraichissant. Je te souhaite pleins de réussite et de bonheur pour la suite.

Je souhaite aux nouveaux venus dans l'équipe : Charlotte, Angélique, Oliver, Thomas, Aurélia. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite ! Je n'ai pas de doute que tout va bien se passer pour vous et que vous irez loin. Merci à Fouzia, Valentin, Estelle, Jean, Marianne et les nombreux autres étudiants qui sont venus dans l'équipe et que j'ai eu l'honneur de pouvoir encadrer.

Merci aux autres doctorants d'être aussi soudés et de pouvoir mettre un peu d'ambiance au laboratoire malgré la situation. Merci à Constance, Manon B., Cyrielle, Adrien, Camille, Milène, Lindsay, Surya, Dorian, Eléonore, Yoann, Victoria, Enora, Manon D...

Je remercie également tous les membres de l'UTE, et en particulier Julien pour toutes les discussions mais surtout pour avoir pris soin de mes petits rattos, sans qui rien n'aurait eu lieu ! Merci également aux membres du secrétariat et à Maud pour tous les coups de mains et votre bonne humeur !

Je remercie également Bastien et Robin pour tous les moments que l'on a pu passer ensemble : les bières, ou mojitos bus, les repas copieux que l'on a pu se faire et la possible non-réussite au casino ! C'est depuis le master que vous subissez mes blagues pourris et mes jeux de mots douteux, sachez que je ne regrette rien. N'oubliez pas, nous nous retrouverons millionnaires !!

Evidemment je remercie mon binôme de bureau, Thomas. Il y a tellement à dire. Je pourrais évoquer l'ambiance incroyable dans le bureau grâce à nous. Je pourrais évoquer les discussions plus ou moins cohérentes et animés que nous avons eu. Je pourrais évoquer les verres et les sorties, consommés avec plus ou moins de modération, les congrès, les 48 heures. Je pourrais évoquer les petits tours en voiture pour tester le fameux « W16 » mais aussi les vidéos incroyable que l'on a pu faire pour le bien de l'ambiance au labo, sans manquer d'avoir l'air un peu ridicule. La liste des moments de travail, ou pas, est longue alors je te dirais juste merci pour tout. Merci d'avoir rendu ces dernières années de thèses bien plus agréables, merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre, même à 7h30/8h00. Merci d'avoir été là, plus qu'un ami, un frère au labo ! Un grand merci.

Evidemment je remercie tous les amis « extérieurs » au laboratoire.

Je remercie Alexis, Julien et Florian pour m'avoir permis de m'aérer l'esprit, de sortir du labo. Je remercie Alexandre *aka* « iLuneth » et Dimitri *aka* « Horus » pour ces soirées Discord endiablées !

Je te remercie Etienne, d'être un véritable ami depuis la licence, dans les moments les plus drôles comme dans les plus critiques. Je te remercie pour les discussions philosophiques à 7 heures du matin et tous les autres moments comme les cours, les repas, les skyperos, mais aussi Bali ! Je remercie Lisa et Sofia pour tous les moments magiques passés, que ce soit à Lyon ou encore à Bali, malgré quelques tremblements de terres plus ou moins stressant ! Merci

Je te remercie Jeremy d'avoir été un ami en or, un soutien constant depuis le début de la licence. Merci pour tout. Je suis certain que nous aurons toujours des coups de génies culinaires qui se révéleront toujours pire ! Je remercie Léo, Mark et Julien d'avoir été là, d'avoir toujours été présent. Je ne peux m'empêcher de penser avec un sourire à notre petite escapade au Japon.

Merci à tous mes amis, Romuald, Amélie, Simon, Romain, Antonin, Morgan et Helene, Guillaume et Sarah, Morgane, Anaïs, Melody, Lucie, Fabien, Claire, Manon, Maxime. Merci pour votre soutien et pour tous les moments partagés.

Enfin je remercie toute ma famille.

Je remercie celles et ceux qui m'ont toujours soutenu mais qui ne sont plus. Merci à mes grands-parents.

Un grand merci à mes parents, Françoise et Sylvain, et à ma sœur, Marion, Merci à vous d'avoir été des exemples et pour m'avoir appuyé tout au long de ma vie. Merci d'avoir toujours été patients, merci d'avoir été présent, pour votre soutien et vos encouragements. Je vous remercie par-dessus tout de m'avoir soutenu, peu importe ce que je voulais faire. Je pense me rendre compte de la chance d'avoir des parents et une sœur comme vous. Il n'existe pas assez de mots pour résumer ma gratitude et ce que vous m'avez apporté. Alors juste Merci.

Table des matières

Remerciements	ii
Table des matières	ix
Table des tableaux	xvi
Table des Figures	xvii
Table des Abréviations	xx
1 Introduction	1
1.1 Bases physiologiques hémodynamiques	3
1.2 Bases de la fonction cardiaque	5
1.3 Déterminants et régulations du débit cardiaque	8
1.3.1.1 La fréquence cardiaque	9
1.3.1.2 Transport et utilisation de l’oxygène	10
1.3.1.3 Volémie et retour veineux	11
1.3.2 Fonction vasculaire, pression artérielle et sa régulation	13
1.3.2.1 Définitions	13
1.3.2.2 Contraction et relaxation des cellules musculaires lisses	14
1.3.2.3 L’endothélium	15
1.3.2.4 Variables et grandeurs régulées	15
1.3.2.5 Régulation de la fonction vasculaire	17
1.3.2.6 La modulation du baroréflexe	18

1.3.2.7	L'activité catécholaminergique	19
1.3.3	Implications en physiopathologies	24
1.4	L'assistance circulatoire mécanique	26
1.4.1	Suppléance cardiaque et cardio-pulmonaire	29
1.4.1.1	Suppléance circulatoire implantable.....	29
1.4.1.2	Suppléance circulatoire extracorporelle	31
1.4.2	Physiopathologie et objectifs thérapeutiques d'une CEC	38
1.4.2.1	Généralités	38
1.4.2.2	Défaillances tissulaires	38
1.4.2.3	Conséquences associées aux assistances circulatoires	40
1.4.3	Axes de recherches actuels et avancées récentes	49
1.4.3.1	Adaptation de la procédure et du monitoring.....	49
1.4.3.2	Principe de base du monitoring.....	54
1.4.4	Optimisation des matériaux.....	56
1.4.4.1	Optimisation des oxygénateurs	57
1.4.5	Les nouvelles approches pharmacologiques	58
1.4.6	Modèles de Suppléance cardio-pulmonaire	60
1.4.6.1	Modèle <i>ex vivo</i>	60
1.4.6.2	Modèle chez le gros animal.....	61
1.4.6.3	Modèle chez le petit animal.....	61

1.5	La voie de réponse intégrée au stress.....	64
1.5.1	La voie de l'ISR et sa régulation.....	64
1.5.1.1	Enzymes initiatrices de la réponse au stress.....	66
1.5.1.2	Régulation de la traduction.....	68
1.5.1.3	Régulation de la traduction par le niveau de phosphorylation de eIF2 α	72
1.5.1.4	Conséquences de l'activation de la voie de réponse intégrée au stress ...	73
1.5.1.5	Implication en physiopathologie	74
1.5.1.6	Modulateurs de la voie de l'ISR.....	75
1.6	Intérêt au traitement dans le SRIS et dans les assistances circulatoires	80
1.7	Objectif et déroulé de l'étude.....	80
2	Méthodes	82
2.1	Expérimentation animal et déclaration Ethique.....	82
2.2	Tests des molécules <i>in vitro</i>	82
2.2.1	Isolement des PBMC issus des rats et mise en culture des monocytes.....	84
2.2.1.1	Prélèvements de sang artériel	84
2.2.1.2	Isolements des monocytes et mise en culture.....	84
2.3	Test de l'impact hémodynamiques des molécules IFB <i>in vivo</i>	86
2.4	Étude du modèle de rat	86
2.4.1	Préparation du circuit de dérivation cardio-pulmonaire.....	86
2.4.2	Préparation des animaux : anesthésie et chirurgie, CEC/Sham, médicaments,	
sevrage	88	

2.4.2.1	Préparation des animaux	88
2.4.2.2	Chirurgie.....	89
2.4.2.3	Surveillance de la pression artérielle et de la température	91
2.4.2.4	Soins postopératoires, surveillance et bio collection.....	91
2.4.2.5	Mesure sur les échantillons de sang	95
2.5	RT-qPCR	97
2.6	Western blots	99
2.7	ELISA immuno assays.....	101
2.8	Histologie pulmonaire.....	102
2.9	Étude sur la cohorte IBIS Témoin	104
2.9.1	Éthique et déclaration.....	104
2.9.2	Inclusion.....	104
2.9.3	Données cliniques, prélèvement et traitement du sang	105
2.9.4	Analyse statistique et traitement des données cliniques	105
2.9.5	Extraction de l'ARN du sang total.....	105
2.10	Analyse transcriptomique	106
2.10.1	Préparation et méthode DGESeq et analyses secondaires	106
2.10.1	Plan expérimental et groupes	107
2.11	Analyses statistiques	109
3	Résultats	110

3.1	Mise au point du modèle sur 30 minutes de CEC et évaluation de l'activation de l'ISR après CEC.....	111
3.1.1	Hémodynamique et hématocrite	111
3.1.2	Western blot des acteurs de l'ISR	113
3.2	Caractérisation du modèle et comparaison avec la clinique	115
3.2.1	Etude chez l'Homme.....	115
3.2.1.1	Démographie	115
3.2.1.2	Biochimie et biomarqueurs plasmatiques.....	118
3.2.1.3	Analyse DGESeq chez le patient.....	120
3.2.2	Validation du modèle avec réveil.....	122
3.2.2.1	Mesures hémodynamiques, du lactate et de l'hémoglobininémie chez le rat 122	
3.2.2.2	Mesures des Gaz du sang, électrolytes	124
3.2.2.3	Mesures biochimiques plasmatiques	125
3.2.2.4	Résultats de l'analyse DGESeq chez le modèle de rat	128
3.3	Efficacité des molécules <i>in vitro</i>	130
3.3.1	RT-qPCR.....	130
3.3.1.1	Dosage des cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant.....	132
3.4	Evaluation de l'effets des molécules dans la CEC chez le rat	133
3.4.1	Test du Cpd-2 sur le modèle de CEC.....	133
3.4.2	Tests sur animal vigile des petites molécules IFB	135

3.4.3	Test du Cpd-3 et de l'IFB-088 sur le modèle de CEC	137
3.4.3.1	Hémodynamique	137
3.4.3.2	Gaz du sang, électrolytes et hémoglobininémie	139
3.4.3.3	Biochimie peropératoire et scores	141
3.4.3.4	Biochimie plasmatique	144
3.4.3.5	Inflammation sur le modèle de rat.....	146
3.4.3.6	Histologie pulmonaire	147
4	Discussion et perspectives.....	152
4.1	Pertinence du modèle	152
4.1.1	Adaptation de la procédure	153
4.1.2	Systèmes de scores	158
4.1.3	Validation hémodynamique et implication de la voie de l'ISR	158
4.1.4	Caractérisation finale du modèle de CEC avec réveil.....	159
4.2	Test des composés modulant la phosphorylation de eIF2 α <i>in vitro</i>	163
4.3	Test des molécules ciblant l'ISR sur le modèle de CEC	164
4.4	Perspectives	168
5	Conclusions	171
6	Conclusion personnelle	172
	Références	174
	Publications	1

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux calculs du débit cardiaques	8
Tableau 2 : Principaux mécanismes de régulations de la pression artérielle	17
Tableau 3 : Principaux Agonistes adrénergiques et leurs cibles/effets	22
Tableau 4 : Exemples de DACM, de leurs utilisations et particularités.	28
Tableau 5 : Comparaison des caractéristiques des pompes occlusives et centrifuges	52
Tableau 6 : Liste des principales molécules décrites afin de moduler la voie de réponse au stress	79
Tableau 7 : Score d'évaluation de la dysfonction multi-organe, inspirée du score SOFA...	93
Tableau 8 : paramètres plasmatique mesurés et méthodes de dosages	96
Tableau 9 : Sondes utilisées en q-PCR	98
Tableau 10 : Compositions des tampons RIPA et de lyse pour extraction des protéines	99
Tableau 11 : Anticorps primaires et secondaires utilisés	101
Tableau 12 : Composition des groupes, des expériences et des effectifs par étude.....	108
Tableau 13 : Données de démographie issue des données cliniques	115
Tableau 14 : Mesures des Gaz du sang et des électrolytes	125
Tableau 15 : Mesure des gaz du sang, des électrolytes et de l'hémoglobininémie dans le modèle de CEC avec ou sans les molécules à tester	140

Table des Figures

Figure 1: Courbe de dissociation de l'oxygène.	4
Figure 2 : Cycle cardiaque.	6
Figure 3 : Mécanisme de Frank Starling.	7
Figure 4 : Courbe de dissociation des gaz du sang. Relation entre pression partielle en oxygène et dioxyde de carbone, échange gazeux et saturation.	11
Figure 5 Courbes de pression artérielle.....	16
Figure 6 : Mécanismes de régulation de la pression artérielle (PA).	18
Figure 7 : Schéma d'un montage ECMO artérioveineux fémoro-fémoral	34
Figure 8 : Schéma d'un montage ECMO veino-veineux.....	35
Figure 9 : Schéma de montage de bypass cardiopulmonaire.	36
Figure 10 : Schéma récapitulatif de l'effet initial de la CEC sur le complément, et les cascades de coagulations	41
Figure 11 : Cascade de coagulation	43
Figure 12 : Voie de réponse intégrée au stress et modulation par des molécules chimiques	65
Figure 13 : Formations des complexes d'initiation de la traduction	70
Figure 14 : Traduction Cap dépendante ou Cap indépendant. D'après (Micalizzi et al., 2021).	71
Figure 15 : Déroulé de l'étude	81

Figure 16 : schéma du montage de CEC chez le rat.	87
Figure 17 : Set-up experimental et canulations pour la CEC chez le rat	89
Figure 18 : Déroulé de la procédure et du protocole durant une journée de chirurgie	94
Figure 19 : Diagramme des inclusions de la cohorte	104
Figure 20 : Surveillance hémodynamique et mesure de l'hémoglobininémie chez le rat au cours du temps.....	112
Figure 21 : Evaluation de l'expression de protéines pulmonaires impliquées dans l'ISR après 30 min de CEC	114
Figure 22 : Mesure de marqueurs plasmatiques rénaux et de stress à partir de sang artériel des patients	119
Figure 23 : Analyse du transcriptome de PBMC de patients ayant subi une chirurgie cardiaque avec CEC.....	121
Figure 24 : Surveillance hémodynamique chez le rat	123
Figure 25 : Mesure de marqueurs plasmatiques rénaux et de stress à partir de sang artériel des rats	127
Figure 26 : L'analyse du transcriptome a été réalisée à partir d'ARN extraits des PBMC de rats ayant subi une CEC.	129
Figure 27 : Evaluation des niveaux de transcrits isolés de PBMC mis en culture en présence de LPS et de molécule ciblant l'ISR.....	131
Figure 28 : Mesure des IL-6 et du TNF- α dans le surnageant de culture des PBMC isolés de rats stressés au LPS	132
Figure 29 : Monitoring hémodynamique au cours de la CEC et en post-opératoire avec ou sans le Cpd-2 administré à 2mg/kg avant la chirurgie	134

Figure 30 : Mesures hémodynamiques des rats ayant reçu un bolus <i>i.p.</i> de molécule à tester chez les animaux vigiles.....	136
Figure 31 : Mesure hémodynamique et de la quantité de phenylephrine administrée durant la CEC avec ou sans molécules administré avant la chirurgie	138
Figure 32 : Paramètres biochimiques mesurés au décours de la procédure et établissement des scores comportementaux et d'évaluation de la présence d'une dysfonction d'organe avec ou sans molécules administré avant la chirurgie	143
Figure 33 : Mesure de marqueurs plasmatiques cardiaque et de stress/dommages tissulaires et hémolyse à partir de sang artériel des rats avec ou sans molécules administré avant la chirurgie	145
Figure 34 : Dosage de l'interleukine 6 (IL-6) dans le plasma des rats avec ou sans molécules administré avant la chirurgie	147
Figure 35 : Coloration au naphtol de coupes des lobes gauches du poumon.....	149
Figure 36 : Immunomarquage de la nitrotyrosine pulmonaire.....	151

Table des Abréviations

•NO	: Monoxyde d'azote
4-PBA	: 4-phénylbutyrate
AC	: Adenylate cyclase
ACE	: Enzyme de conversion de l'angiotensinogène
ACT	: Temps de coagulation activée
AGAP	: Trou ionique
AKI	: <i>Acute Kidney Injuries</i>
ALI	: <i>Acute lung injuries</i>
AMPc	: Adénine monophosphate cyclique
ANP	: Peptide auriculaire natriuretique
AR	: Récepteur adrénergique
AT2	: Angiotensine II
ATF4	: <i>Activated Transcription factor</i>
AT-III	: Antithrombine III
BE	: Excès de base
BGEM	: <i>Blood Gases Electrolytes Metabolites</i>
BiP	: <i>Binding immunoglobulin protein</i>
CaM	: Calmoduline
CEC	: Circulation extracorporelle
CHOP	: <i>C/EBP Homologous Protein</i>
CML	: Cellules musculaire lisses ou Leiomyocytes
DACM	: Dispositifs d'assurances circulatoires mécaniques
DAV	: Différence artério-veineuse
DGE	: <i>Differential gene expression</i>
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde
D-PBS	: <i>Dulbecco's Buffered Saline</i>
ECLS	: <i>Extracorporeal life support</i>
ECMO	: <i>Extracorporeal membrane oxygenation</i>
EDTA	: <i>Éthylènediaminetétraacétique</i>
eIF2 α	: Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2
FC	: Fréquence cardiaque
FDA	: <i>Food and drug administration</i>
FiO ₂	: Fraction inspirée en oxygène
GADD34	: <i>Growth arrest DNA damage inducible protein</i>
Gapdh	: <i>Glyceraldehyde phosphate déshydrogénase</i>

GCN2	: <i>General control nonderepressible 2</i>
GCs	: Guanylate cyclase soluble
HAS	: Haute Autorité de Santé
Hb	: Hémoglobine
Hct	: Hématocrite
HDL	: <i>High density lipoproteins</i>
HNF	: Héparine non-fractionnée
HRI	: <i>Heme regulated inhibitors</i>
HRP	: <i>Horse radish peroxydase</i>
HSP	: <i>Heat shock protein</i>
IABP	: Ballon de contre pulsion intra aortique
IFB	: InFlectis BioScience
IL	: Interleukin
ISR	: <i>Integrated stress response</i>
KDIGO	: <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
LDH	: Lactate deshydrogénase
LPS	: Lipopolysaccharide
MARK2	: <i>Microtubule affinity-regulating kinase 2</i>
MLC20	: Chaîne légère de la myosine
MLCK	: Kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	: Phosphatase des chaînes légères de la myosine
mTOR	: <i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NAD	: Noradrénaline
NButGT	: 1,2-dideoxy-2'-propyl- α -d-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline
NFS	: Numération formule sanguine
NIRS	: <i>Near infrared spectroscopy</i>
NOS	: <i>NO synthase</i>
OG	: Oreillette Gauche
PA	: Pression artérielle
PAC	: Pontage aorto coronarien
PaCO ₂	: Pression partielle en CO ₂
PAD	: Pression artérielle Diastolique
PAM	: Pression artérielle Moyenne
PAoM	: Pression aortique moyenne
PAPM	: Pression artérielle pulmonaire moyenne
PAS	: Pression artérielle systémique
PBMC	: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>

PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PERK	: <i>PKR-like ER protein kinase</i>
PKA	: Protein kinase A
PKG	: Protéine kinase G
PKR	: Protéine kinase-R
PMSF	: fluorure de phénylméthanesulfonyle
PO ₂	: Pression partielle en oxygène
POD	: Pression auriculaire droite,
POG	: Pression auriculaire gauche
PP1c	: <i>Protein phosphatase 1c</i>
Ppp1R15a	: <i>Protein phosphatase1 regulatory subunit 1a</i>
PVDF	: Polyfulorure de vinylidène
Qc	: Débit cardiaque
RCPG	: Récepteur couplé aux protéines
RE	: Réticulum endoplasmique
REGULATE-PCI	: <i>REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention</i>
RIPA	: <i>Radioimmunoprecipitation</i>
RL	: Ringer lactate
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RV	: Retour veineux
RVP	: Résistance vasculaire pulmonaire
RVS	: Résistance vasculaire systémique
SaO ₂	: Saturation artérielle en oxygène
SD	: Standard deviation
SEM	: Standard error mean
SOFA	: Sequential Organ Failure assesment
SRA	: Système rénine angiotensine
SRIS	: Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SvO ₂	: Saturation veineuse en oxygène
TA	: Temperature Ambiante
TaO ₂	: Transport d'oxygène
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TRIS	: <i>Trisaminométhane</i>
TUDCA	: Acide tauro-urso-désoxycholique
UMAC	: Unité mobile d'assistance circulatoire
uORF	: <i>Upstream Open Reading frame</i>

VA	: Veno-arterial
VES	: Volume d'éjection systolique
VG	: Ventricule gauche
VO2	: Utilisation en O2
VR	: Réservoir veineux
VTD	: Volume Télé diastolique
VTs	: Volume Télé systolique
VV	: <i>Veno-venous</i>
vWF	: <i>Von Willebrand factor</i>
Ywhaz	: <i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i>

1 Introduction

L'objectif de ma thèse CIFRE est d'évaluer le potentiel thérapeutique la modulation de la voie de réponse intégrée au stress (ISR) par de petites molécules, développées par InFlectis BioScience, dans le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) associé à une circulation extracorporelle. Le SRIS est caractérisé par la dérégulation d'une réaction inflammatoire systémique dont la persistance et l'intensité peut aboutir à des dysfonctions multi-organes conduisant potentiellement au décès du patient. Un SRIS peut se manifester dans de nombreuses pathologies tels que les chocs (septique, hémorragique, cardiogénique), les traumatismes accidentels ou chirurgicaux. Parmi ces derniers, nous trouvons les assistances circulatoires extracorporelles avec les circulations extracorporelles (CEC) (*cardiopulmonary bypass* en anglais) : procédure *gold standard* en chirurgie cardiaque qui permet de remplacer le cœur et les poumons et d'isoler ces organes pour l'intervention chirurgicale et l'ECMO (*extra-corporeal membrane oxygenation*) une autre forme de CEC, qui correspond à une assistance circulatoire permettant de remplacer ou suppléer la fonction cardiaque et/ou respiratoire du patient. Le contact du sang avec les éléments extrinsèques (canules, tubulures, membrane, air), ainsi que l'ischémie/re-perfusion associée, déclenchent une réponse inflammatoire, associée à une coagulopathie qui favorisent la survenue de dysfonction multi-organes (Al-Fares et al., 2019). Plus la durée d'intervention sous CEC est longue, plus les conséquences néfastes du SRIS et de la coagulopathie sont probables. Dans ce contexte, il est intéressant de développer de nouveaux moyens pharmacologiques permettant de réduire la manifestation du SRIS et/ou de ses potentielles complications. Dans un autre modèle de SRIS, InFlectis BioScience a déjà montré que l'action d'un inhibiteur d'un complexe phosphatase intervenant dans l'ISR pouvait avoir des effets bénéfiques. Inhiber l'activité du complexe phosphatase GADD34/PP1c permet de prolonger l'ISR et donc l'état de réponse au stress de la cellule laissant ainsi plus de temps à la cellule pour résoudre le stress (Pakos-Zebrucka et al., 2016)

Les travaux de cette thèse ont eu pour but d'apporter la preuve de concept de l'intérêt d'utiliser des molécules inhibitrices du complexe phosphatase GADD34/PP1c dans le SRIS et dans la dysfonction multi-organes lors d'une circulation extracorporelle.

Dans un premier temps les éléments théoriques et pratiques physiologiques et pharmacologiques cardiovasculaire seront présentés dans ce manuscrit afin de permettre la compréhension de la CEC ainsi que des éléments de discussions. Ensuite les grands principes de la CEC et des conséquences physiopathologiques seront discutés suivi de la présentation de l'ISR et de la stratégie adoptée pour cette étude.

Dans un second temps la méthodologie appliquée sera détaillée afin de pouvoir développer et décrire les résultats qui seront enfin discutés.

1.1 Bases physiologiques hémodynamiques

Les systèmes cardiaque, vasculaire et respiratoire assurent une stabilité du milieu intérieur ou homéostasie par l'adéquation entre les apports et les besoins métaboliques tissulaires en O_2 (oxygénation) et de décharger l'excès de CO_2 (décarboxylation) des tissus. Plusieurs déterminants vont jouer dans l'accomplissement de ces objectifs dont voici les principaux : la fonction pulmonaire par la ventilation et la diffusion alvéolo capillaire, la fonction du tissu sanguin par le transport de l' O_2 (TaO_2), la fonction cardio-vasculaire et la capacité d'extraction et d'utilisation en O_2 tissulaire (VO_2). Cela signifie que les fonctions cardiaques et ventilatoires sont régies par les besoins tissulaires en oxygènes.

Ainsi le débit cardiaque (Q_c), correspondant au volume de sang éjecté par le ventricule gauche par minute, est adapté en fonction des besoins en oxygène des différents organes par différents mécanismes de régulation. Il sera ensuite réparti de façon adaptée au niveau des différents organes en fonction des besoins. Ainsi, le TaO_2 est principalement sous la dépendance du débit mais il est également fonction de la saturation artérielle en oxygène (SaO_2) et de la concentration en hémoglobine (Hb).

La SaO_2 est dépendante de la pression partielle en oxygène (PO_2) selon une relation non linéaire observable sur une courbe de dissociation de l'oxygène, représentant l'affinité de l'Hb pour l' O_2 (**Figure 1**). L'influence de paramètres tels que la pression partielle en CO_2 et le pH sur cette courbe permet de décrire des changements de la saturation en oxygène sans changement de la PO_2 , aussi appelé effet Bohr. (**Figure 1**)

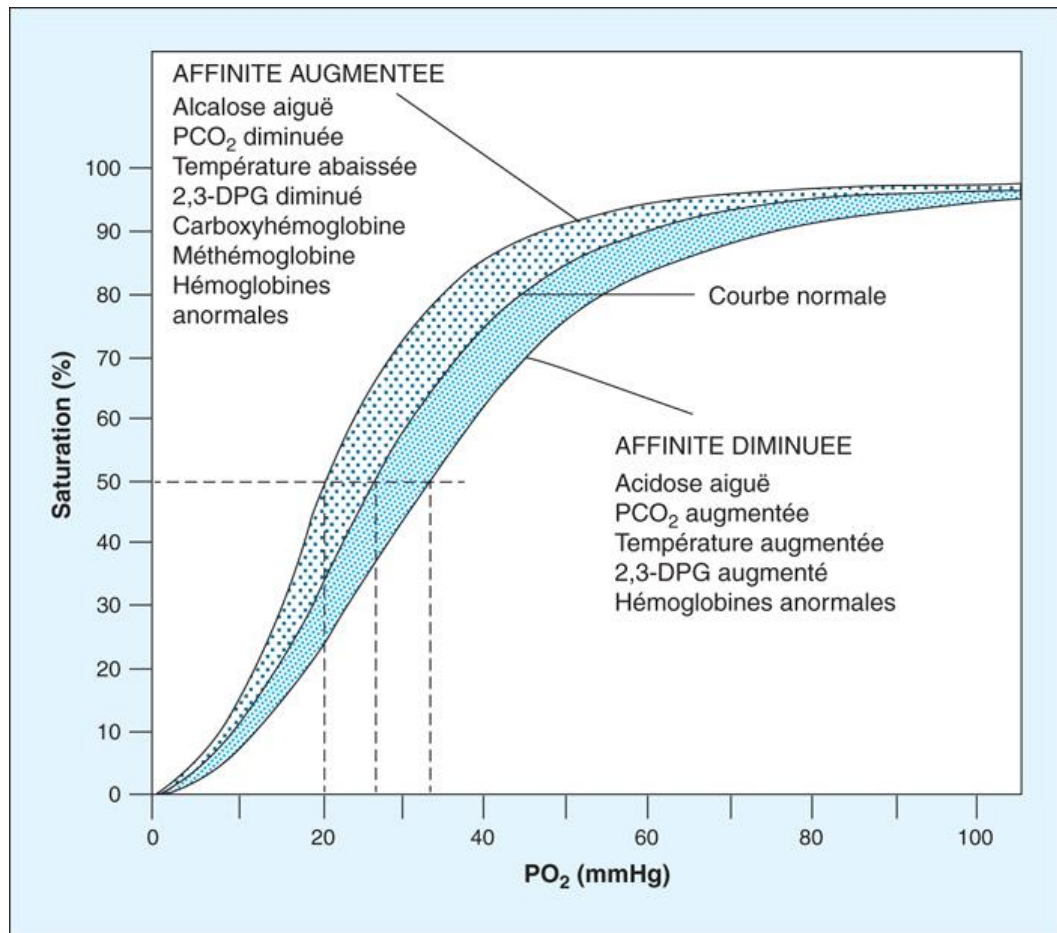


Figure 1: Courbe de dissociation de l'oxygène.

Courbe représentant la saturation en oxygène sanguine en fonction de la pression partielle en dioxygène (PO_2). Sont représentés également la courbe d'affinité en conditions normales et deux cas de d'affinités modifiées en réponses aux variations de pH, de pressions partielles en CO_2 (PCO_2) et des températures ou de l'hémoglobinémie. Adapté de Godignon et al., 2017 (Godignon et al., 2017)

Comme tous les échanges gazeux, la capacité de saturation de l'hémoglobine est, en effet, dépendante de la pression partielle des gaz impliquée. Lorsque les besoins métaboliques augmentent, l'augmentation du débit cardiaque permet d'adapter le transport en oxygène aux besoins.

Cela implique que lors d'insuffisance respiratoire aiguë (hypoxie aiguë) ou de défauts de présence d'hémoglobine (anémie), l'organisme ne peut s'adapter et maintenir constant le transport en oxygène que si le débit peut augmenter. Les mécanismes responsables de la régulation du Q_c sont donc des déterminants du contrôle hémodynamique et circulatoire et seront explicités dans la suite du manuscrit.

1.2 Bases de la fonction cardiaque

Le cœur sain a une activité électrique et une activité mécanique musculaire synchrones et liés qui forment des cycles de contraction et relaxation. L'activité menant à ce cycle peut être séparée en 2 phases distinctes nommées systoles et diastoles qui correspondent respectivement à la contraction cardiaque et l'éjection du sang et à la relaxation myocardique et au remplissage des cavités.

Dans un souci de simplification, le déroulement d'un cycle cardiaque sera détaillé uniquement pour le cœur gauche. Les mêmes étapes se déroulent au niveau du cœur droit :

La phase systolique va débiter par l'élévation de la pression intraventriculaire qui induira la fermeture de la valve mitrale. Ce sera suivi des étapes successives suivantes :

- Lors de la contraction la pression ventriculaire augmente tout d'abord sans modification du volume ventriculaire : contraction isovolumique.
- Cela induit un gradient de pression négatif entre la pression artérielle et ventriculaire qui est à l'origine de l'ouverture de la valve aortique.
- Le sang contenu dans le ventricule va alors être éjecté vers l'aorte. Le volume de sang déchargé par le ventricule gauche est appelé volume d'éjection systolique (VES).
- Cela provoque une dépression intra-ventriculaire et donc la fermeture de la valve aortique ; on parle de la télésystole.

La phase diastolique est amorcée par une relaxation isovolumique : le muscle cardiaque se relâche sans variation du volume intraventriculaire. Elle est suivie par les étapes suivantes jusqu'à la fermeture de la valve mitrale :

La pression du ventricule gauche (VG) alors inférieure à celle de l'oreillette gauche (OG) induit l'ouverture de la valve mitrale et initie un remplissage rapide et passif du VG.

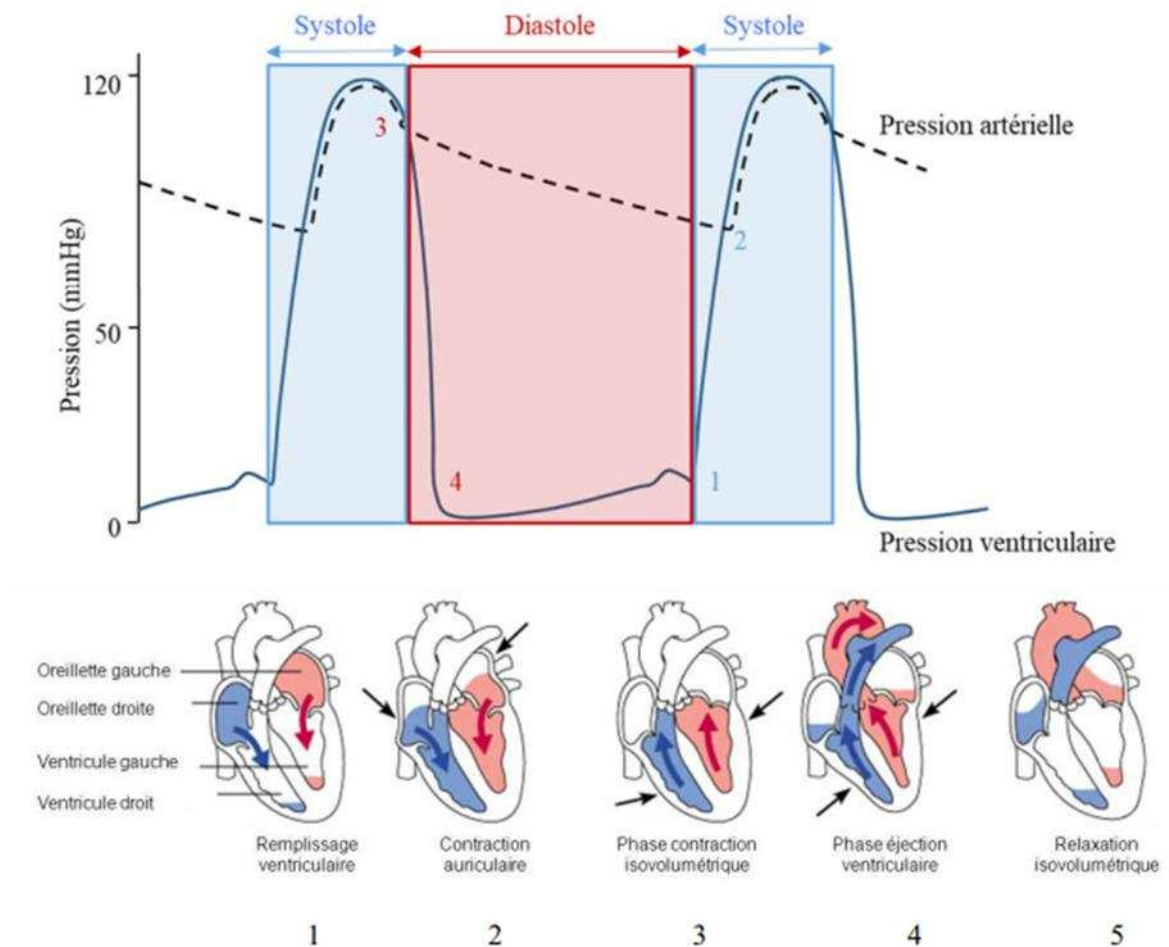


Figure 2 : Cycle cardiaque.

Représentation adaptée de R. E. Klabunde, 2021 (R. E. Klabunde, 2021). Début de systole cardiaque avec la contraction isovolumétrique et la fermeture de la valve mitrale (1). Début de l'éjection du sang avec l'ouverture de la valve aortique (2). Fin de la systole et début de la diastole avec la fermeture de la valve aortique (3). Cette étape correspond à la relaxation isovolumétrique. L'ouverture de la valve mitrale (4) permet le commencement du remplissage cardiaque avec une phase rapide puis une phase lente. Le remplissage se termine par une systole auriculaire ce qui entraîne le début d'un nouveau cycle cardiaque.

En situation physiologique, 70 à 80 % du remplissage a lieu pendant cette phase diastolique. La phase de remplissage lent ou diastase : les pressions s'égalisent entre l'oreillette gauche et le VG entraînant une réduction du flux auriculo-ventriculaire. Moins de 5 % du remplissage est réalisé lors de la diastase. Finalement le remplissage actif a lieu par la contraction de l'oreillette qui va chasser le sang qui remplissait l'oreillette vers le

ventricule. Cette phase représente 20 à 30 % du remplissage. Le remplissage des ventricules induit une augmentation de la pression intra-ventriculaire qui est supérieure à la pression auriculaire entraînant une fermeture de la valve mitrale et la fin de la diastole : on parle de la télédiastole. La pression télédiastolique s'établit à l'équilibre entre l'oreillette et le ventricule. Cela marque aussi le début de la phase de contraction isovolumique et donc d'un nouveau cycle cardiaque. La fonction systolique est alors très dépendante de la capacité de remplissage des cavités, précharge, et des pressions qui règnent dans le système veineux central, pulmonaire et aortique. Cela est illustré par le mécanisme de Frank-Starling qui explique la relation entre l'étirement des fibres musculaires myocardiques et leur performance contractile (Hamilton, 1960; Starling and Visscher, 1927). C'est-à-dire que, dans une limite physiologique, l'étirement des fibres conditionnent leurs capacités contractiles. L'étirement au niveau ventriculaire est généré lors du remplissage. Cela implique qu'un remplissage efficace permettra de créer une tension importante de la paroi du VG et ainsi une bonne restitution du VES.

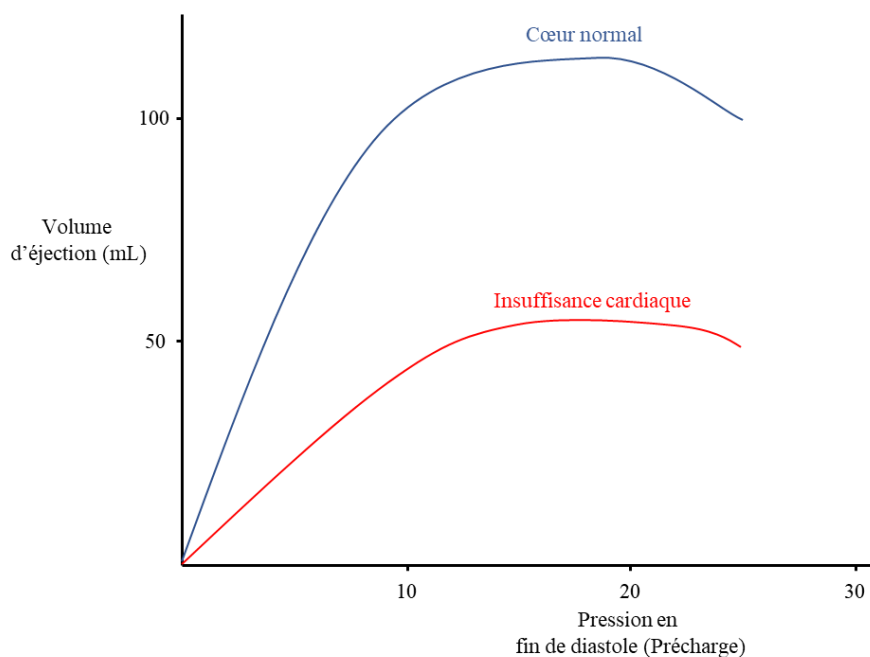


Figure 3 : Mécanisme de Frank Starling.

Représentation schématique du mécanisme de précharge dépendance de l'éjection ventriculaire pour des cœurs normaux (bleu) et insuffisant cardiaque (rouge) proposé par Frank et Starling (Hamilton, 1960; Starling and Visscher, 1927).

1.3 Déterminants et régulations du débit cardiaque

Le débit cardiaque est défini comme le produit de la fréquence de répétition du cycle cardiaque (fréquence cardiaque, FC) et du VES. Sa modulation pourra par exemple s'effectuer à la suite :

- D'une modification du VES, par exemple à la suite de la modification de la précharge
- De la modification de la capacité contractile cardiaque
- De sa compliance, qui correspond à la capacité de l'organe de s'adapter aux variations de pressions, majoritairement liée à la capacité élastique
- Par la régulation de la fréquence cardiaque

Ce débit peut-être également expliqué par d'autres déterminants essentiels à sa régulation, ces déterminants sont détaillés dans la suite de ce manuscrit (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principaux calculs du débit cardiaques

Calcul du débit cardiaque	Signification	Loi impliquée	
VO_2 / DAV	Dépendance de la consommation en oxygène	Loi de Fick	
$FC \times VES$ $Fc \times (VTD - VTS)$	Définition du débit cardiaque		
$QC_{gauche} = RV_{pulm} / min$ $QC_{droite} = RV_{sys} / min$	Dépendance de la précharge		
$(PAoM - POD) / RVS$ $(PAPM - POG) / RVP$	Gradient de pression motrice	Couplage ventriculo-artériel	

Fc : fréquence cardiaque ; PAoM : pression aortique moyenne ; PAPM : pression artérielle pulmonaire moyenne ; POD : pression auriculaire droite, POG : pression auriculaire gauche, POD et POG sont assimilées à la pression en débit nul dans la circulation systémique et pulmonaire] ; RVP : résistance vasculaire pulmonaire ; RVS : résistance vasculaire systémique ; VES : volume d'éjection systolique ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit ; VO2 : consommation d'oxygène ; VTS : volume télé systolique ; VTD : volume télé diastolique.

1.3.1.1 La fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque est le paramètre le plus simple à explorer ; il a un rôle central dans la régulation rapide du débit cardiaque. Cette relation est explicable par le phénomène de Treppe (ou de l'escalier) aussi appelé effet Bowditch qui peut être responsable de 40% de l'augmentation du débit cardiaque (Usman et al., 2021). Il s'agit de la relation positive entre l'augmentation de la fréquence cardiaque et l'augmentation de la force contractile. Par exemple, pour donner suite à un stimulus (sympathique par exemple) induisant une augmentation de la fréquence cardiaque il est observé une augmentation de la force de la contractilité des cellules myocardiques.

En période de repos, la FC est déterminée par l'activité automatique électrique, ou activité pacemaker, généré au sommet de l'oreillette droite par un complexe cellulaire formant le nœud sinusal ou nœud de Keith et Flack. La régulation de la FC se fait par différents mécanismes centraux ou périphériques nerveux, humoraux et mécaniques soit excitatrices (tachycardisant) soit inhibitrices (bradycardisant). Les influences centrales sont :

- Parasymphathiques permettant la diminution de la FC, effet chronotrope négatif ou bradycardisant, action principalement médiée par la libération d'acétylcholine et son action sur les récepteurs muscariniques.
- Sympathiques induisant un effet chronotrope positif ou tachycardisant médiée majoritairement par la libération de Noradrénaline (NAD) et son action cardiaque principalement sur les récepteurs β_1 -adrénergiques.

Ces mécanismes sont complétés par une régulation centrale ou périphérique *via* des boucles réflexes de régulations dont voici quelques exemples :

- Le baroréflexe qui permet de réguler la pression artérielle à court terme. Les barorécepteurs situés au niveau de l'oreillette droite, de la circulation pulmonaire et de la crosse de l'aorte sont sensibles à l'étirement des vaisseaux associés à l'augmentation des pressions au-delà d'un seuil. L'activation de barorécepteurs va entraîner une diminution du tonus sympathique.

- L'activation des chémorécepteurs carotidiens, coronariens et aortique sensibles aux variations de l'équilibre acido-basique, principalement par une sensibilité à l'ion bicarbonate HCO_3^- .
- L'activation de volorécepteur, récepteurs sensibles à la déformation de la paroi, permet de réguler la fréquence pour adapter la fonction cardiaque à une variation de la volémie. Par exemple, l'augmentation de la volémie entraîne une déformation de la paroi et une activation des volorécepteurs induisant une diminution du tonus sympathique.
- La stimulation catécholaminergique est effective également par la libération d'adrénaline par les glandes medullo-surréaliennes.

1.3.1.2 Transport et utilisation de l'oxygène

Comme décrit en préambule, la régulation du débit cardiaque se fait en fonctions des besoins, du transport et de la consommation en oxygène tissulaire (McDonald et al., 1966). Le débit cardiaque va ici être dépendant du rapport entre la VO_2 et la différence artérioveineuse en oxygène (DAV). Cela implique que la fonction respiratoire fonctionne correctement et que la capacité de l'Hb à prendre en charge et à transférer l' O_2 soit efficace. La capacité à fixer l'oxygène est donc limitée par la quantité d'hémoglobine totale. Le pourcentage d'oxyhémoglobine rapporté à la capacité maximale de fixation de l'oxygène définit la saturation en oxygène de l'hémoglobine (SO_2). En situation physiologique, cette saturation est maximale au niveau du sang artériel (SaO_2) et minimal dans le sang veineux (SvO_2). Comme figuré sur cette courbe de dissociation de l'hémoglobine, la saturation est directement proportionnelle à la pression partielle en oxygène (PO_2) dans le compartiment sanguin (**Figure 4**). En situation physiologique, une $\text{SaO}_2 > 96\%$ correspond à une $\text{PaO}_2 > 80 \text{ mmHg}$ et qu'une $\text{SvO}_2 = 75\%$ correspond à une $\text{PaO}_2 = 40 \text{ mmHg}$. Un dysfonctionnement dans la diffusion alvéolo capillaire de l'oxygène ou un dysfonctionnement touchant l'affinité et le fonctionnement de l'hémoglobine va décaler cette courbe.

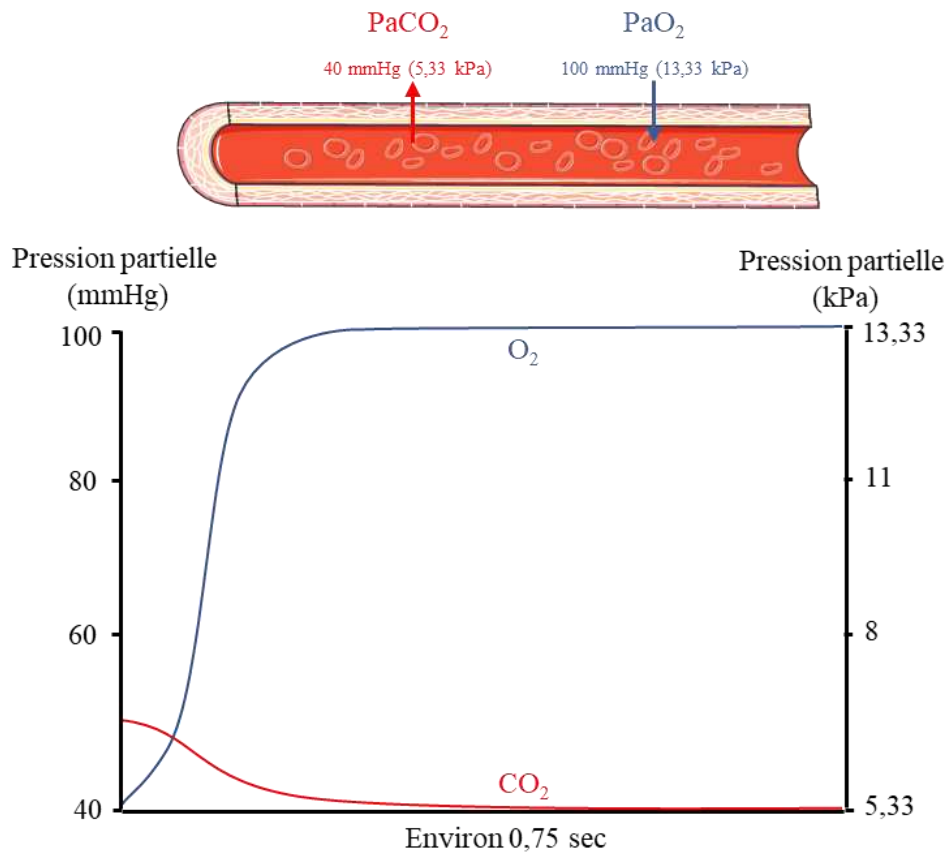


Figure 4 : Courbe de dissociation des gaz du sang. Relation entre pression partielle en oxygène et dioxyde de carbone, échange gazeux et saturation.

La modification du débit cardiaque en réponse à la demande tissulaire peut s'adapter lorsque la demande métabolique tissulaire va être modifiée, par exemple, en réponse à un effort physique, à un stress tissulaire important ou encore à une modification de la température.

1.3.1.3 Volémie et retour veineux

La volémie est définie ici comme étant le volume sanguin total circulant au sein d'un organisme. Pour une grande majorité de mammifères, la volémie théorique est d'environ 65 ml/kg. Ce volume circulant est décomposé de 1) une phase liquide : le plasma, solution colloïdale complexe qui représente 55-60% de la volémie, 2) une partie globulaire en grande majorité composée des hématies (ou érythrocytes), porteuses d'Hb, et 3) monocytes, plaquettes et polynucléaires. Le pourcentage du volume occupé par les hématies définit l'hématocrite (Hct). Il est utilisé pour définir un état physiopathologique (hémodilution,

hémolyse, œdèmes par exemple) lorsqu'il est associé aux données de concentrations de l'Hb. Les modifications d'Hct impactent directement la viscosité du sang et la pression oncotique pression colloïde osmotique, qu'il exerce, c'est-à-dire la pression exercée par la présence de grosses molécules, principalement des protéines, attirant l'eau des secteur extra vasculaire.

Cette volémie est répartie au niveau thoracique (20%, cœur et poumon) et en majeure partie au niveau systémique (80 %) : veineuse (60 %), artérielle (15 %), capillaires (5 %). On peut définir 2 secteurs : haute pressions ou résistif et basse pressions ou capacitif qui accueillent respectivement environ 30 % et 70 % de la volémie. La modification de la volémie globale ou d'un des 2 secteurs pourra entraîner une modification hémodynamique et de la perfusion tissulaires. Une faible proportion de la volémie va contribuer à une hémodynamique active dans le secteur artériel en dépendant d'un gradient de pression motrice intravasculaire.

La régulation des volémies de ces différents compartiments, de la compliance et de la résistance vasculaire va moduler à la fois :

- Le retour veineux au cœur donc la précharge droite
- La pression contre laquelle le muscle cardiaque va lutter pour imposer un débit cardiaque.

À moyen et long terme, la volémie peut être ajustée par la diurèse et la fonction rénale.

Le retour veineux est conditionné par la différence de pression entre le compartiment veineux et la pression de l'oreillette droite, ce que l'on appelle la pression motrice de l'oreillette droite : la vidange de l'oreillette dans le ventricule induit une différence de pression avec le compartiment veineux en amont. Cette différence de pression permet l'aspiration du sang veineux dans l'oreillette. Cela implique que les pressions, même basses, de ce compartiment veineux vont influencer directement le remplissage des cavités cardiaques et donc le débit cardiaque (diagrammes de Guyton et de Frank-Starling).

Si nous mettons en relation les définitions de la volémie et du retour veineux il apparaît évident que la volémie peut impacter directement le RV et ainsi le Qc et donc la fonction circulatoire.

Plusieurs cas peuvent impacter le débit cardiaque, le retour veineux systémiques ou pulmonaire et une modification de la pression motrice de l'oreillette droite :

- Dysfonction cardiaque droite à la suite d'une hypertension artérielle pulmonaire : la pression contre laquelle lutte le ventricule droit lors de la systole est trop importante et entraîne une dilatation du ventricule droit, une dysfonction contractile et du remplissage. Le remplissage moins efficace va entraîner une insuffisance à la fois au niveau du RV et du Qc.
- Les cas d'hypovolémie ou les pressions systémiques seront diminués :
 - Absolue : correspond à une diminution du volume sanguin circulant par exemple lors d'une hémorragie, ou lors de la perte de volume plasmatique (œdèmes, extravasation interstitielle, perte digestives)
 - Relative : associée à une mauvaise répartition de la volémie entre les différents compartiments vasculaires ou une perte de la résistance vasculaire, principalement veineuse, par exemple avec une veino-dilatation. Cette hypovolémie relative peut être retrouvée dans les cas de :
 - Chocs septiques
 - Endotoxiniques
 - Inflammations systémiques aiguës par exemple associés à des stress chirurgicaux où est décrit une diminution des pressions systémiques sans modification de la volémie voir avec son augmentation.

1.3.2 Fonction vasculaire, pression artérielle et sa régulation

1.3.2.1 Définitions

La principale fonction de la vasomotricité est de maintenir une répartition du débit d'origine cardiaque avec une pression nécessaire à une perfusion constante des organes. Les vaisseaux sanguins sont composés de 3 tuniques concentriques de la lumière à la périphérie : l'adventice, le média et l'intima. Ces tuniques sont dotées de composantes dont la proportion définit leurs fonctions. Par exemple, les artères de conduction comme l'aorte, artère pulmonaire ont une forte composante élastique. Les éléments de régulations vasculaires sont principalement 1) les cellules musculaires lisses, qui sont les unités contractiles responsables

de la vasomotricité, du tonus de base vasculaire ainsi que de la signalisation et de la régulation de cette motricité et 2) l'endothélium vasculaire, tapissant la paroi luminale est important dans la régulation de la fonction motrice et dans la perméabilité vasculaire.

La régulation des pressions et débit de perfusions est sous l'influence de mécanismes extravasculaire (volémie, débit cardiaque, système neuroendocrine par exemple) et vasculaire. La régulation vasculaire des pressions et débit se font en grande partie grâce à la modification du diamètre des vaisseaux, ou vasomotricité : vasorelaxation ou vasoconstriction.

1.3.2.2 Contraction et relaxation des cellules musculaires lisses

Dans les cellules musculaires lisses ou léiomyocytes vasculaires, deux types de *stimuli* vont pouvoir induire l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique libre nécessaire à la contraction : (i) une dépolarisation membranaire ou couplage électromécanique et (ii) par la fixation d'agonistes sur des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou couplage pharmaco-mécanique. Cette mobilisation s'effectue par activation des récepteurs à la ryanodine pour le couplage électromécanique et par activation de la voie impliquant la protéine Gq/la phospholipase C /l'inositol triphosphate et le récepteur à l'inositol triphosphate pour le couplage pharmaco mécanique. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracytoplasmique va permettre la mobilisation de la machinerie contractile. La formation d'un complexe Ca^{2+} calmoduline (CaM) induit la libération de la sous-unité catalytique de la CaM qui possède une action de sous-unité régulatrice de certaines enzymes tels que la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). La CaM démasque le site catalytique de la MLCK et donc la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC20). Cela entraîne un changement de conformation de la tête de myosine qui peut se fixer sur l'actine et hydrolyser une molécule d'ATP. Cela induit un basculement de la tête de myosine et permettre la contraction. A l'inverse la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) va inhiber la contraction des CML en déphosphorylant la MCL20 empêchant ainsi l'interaction entre la myosine et l'actine.

La relaxation des léiomyocytes, s'effectue par un retour des concentrations de Ca^{2+} à une valeur de repos et une désensibilisation de l'appareil contractile. Ce dernier mécanisme

implique des facteurs vasodilatateurs qui agissent sur l'endothélium et/ou sur les léiomyocytes, induisant l'activation de la MLCP et l'inactivation de la MLCK. La désensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} peut-être réalisée *via* 2 voies de signalisation : (i) la voie adénylate cyclase / 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPC)/protéine kinase A et (ii) la voie guanylate cyclase / 3',5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc)/protéine kinase G.

Ces voies sont des éléments ciblés par la pharmacologie permettant la modulation de la vasomotricité.

1.3.2.3 L'endothélium

L'endothélium joue en premier lieu un rôle de barrière semiperméable entre le sang et les tissus en permettant le passage sélectif de certaines molécules, ce qui participe à l'homéostasie plasmatique. Ce phénomène va régir en grande partie les échanges au niveau de la microcirculation des capillaires.

En revanche, pour les artères de plus gros calibre dont la fonction n'est pas de servir de surface d'échanges, les cellules qui tapissent le lit vasculaire sont garantes de l'étanchéité. Elles doivent donc résister aux contraintes hémodynamiques locales. L'endothélium joue un rôle important dans la régulation de la vasomotricité, la perméabilité vasculaire et la prévention des phénomènes thrombotiques. Il est important ici de noter que cet endothélium est partiellement protégé de l'abrasion et des contraintes de cisaillements par le glycocalyx. Ce dernier est composé de glycoprotéines chargées négativement et est important dans la fonction vasculaire et dans l'interaction avec les éléments circulants notamment dans les phénomènes inflammatoires et de coagulation.

1.3.2.4 Variables et grandeurs régulées

Le principal paramètre régulé est la pression artérielle moyenne (PAM) c'est-à-dire la pressions moyenne résultante des pressions mesurée lors de la systole (PAS, max) et de la diastole (PAD, min) selon l'équation suivante : $PAM = (PAS + 2 * PAD) / 3$

Chez les mammifères terrestres, si la fréquence cardiaque normale est, dans la plupart des cas, dépendantes de la taille de l'animal (au repos chez l'adulte : Homme $\approx$ 70 bpm, Rat

≈ 350 bpm), les pressions artérielles normales sont assez conservées : PAS = 120 mmHg ; PAD = 80 mmHg ; PAM = 90 mmHg.

La PAM est la résultante du débit cardiaque et de la résistance à ce débit cardiaque au niveau systémique ou résistance vasculaire systémiques (RVS) et de la pression exercée si le débit est nul (P_0) : $PAM = RVS * Q_c + P_0$

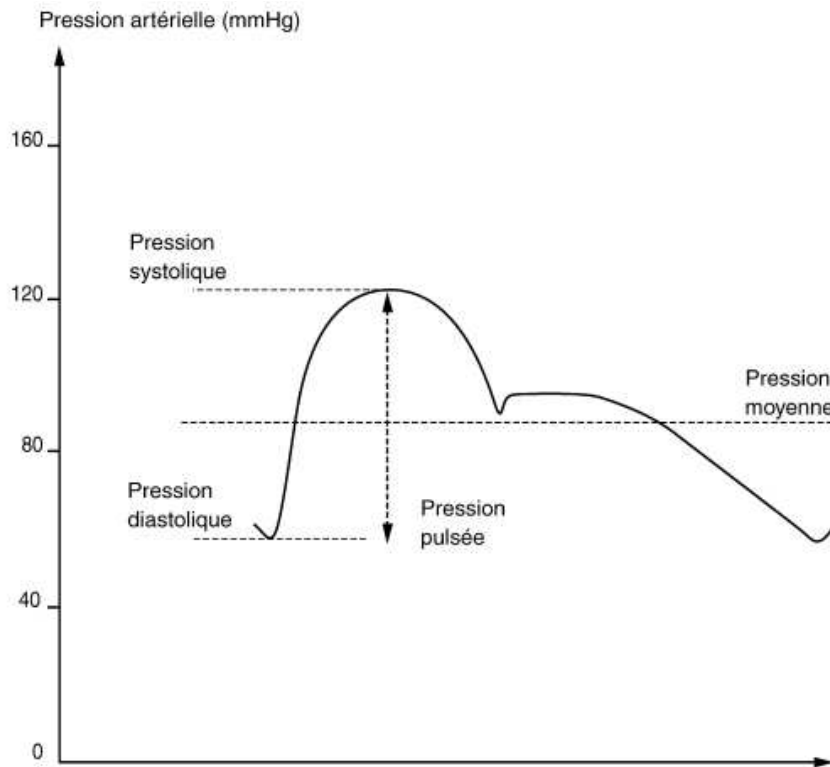


Figure 5 Courbes de pression artérielle

Issus de Asmar et al., 2007 (Asmar, 2007)

Cette résistance vasculaire systémique est particulièrement importante dans la régulation des pressions et donc du débit cardiaque. Elle va être dépendante des surfaces vasculaire (diamètres des vaisseaux résistifs et longueur de l'arbre vasculaire) mais également de la viscosité du sang en suivant la loi de Poiseuille. Cela introduit donc 2 éléments de régulations : l'hématocrite et la composition du tissu sanguin qui ont déjà été discutés et la vasomotricité qui sera abordée par la suite.

1.3.2.5 Régulation de la fonction vasculaire

La régulation de la fonction vasculaire est fine et complexe et assume différentes influences d'origines centrale autant que périphériques (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Principaux mécanismes de régulations de la pression artérielle

Source	Mécanisme
Cardiaque	Débit cardiaque
Hépatique	Régulation des pressions oncotiques : Synthèse d'albumine
Centrale : Inhibition du baroréflexe	Stimulation sympathique (associée à une effet Chronotrope et inotrope positif + augmentation du retour veineux) et inhibition du parasympathique
Centrale : Stimulation du baroréflexe	Stimulation du parasympathique (associée à une bradycardie) et inhibition du sympathique
Rénal	Système rénine angiotensine, débit de filtration des capillaires systémiques
Neuro-hormonale	Aldostérone, Peptides natriurétiques, catécholamines, Angiotensine, endothéline 1, thromboxane A2
Médiateurs	Inflammation, Monoxyde d'azote ($\bullet$ NO), Prostaglandines
Intrinsèque	Autorégulation myogénique, Vasodilatation débit dépendante, concentration potassique intracellulaire, ...

Ces différentes régulations se mettent en place avec des cinétiques plus ou moins rapide et seront plus ou moins persistante dans le temps (**Figure 6**).

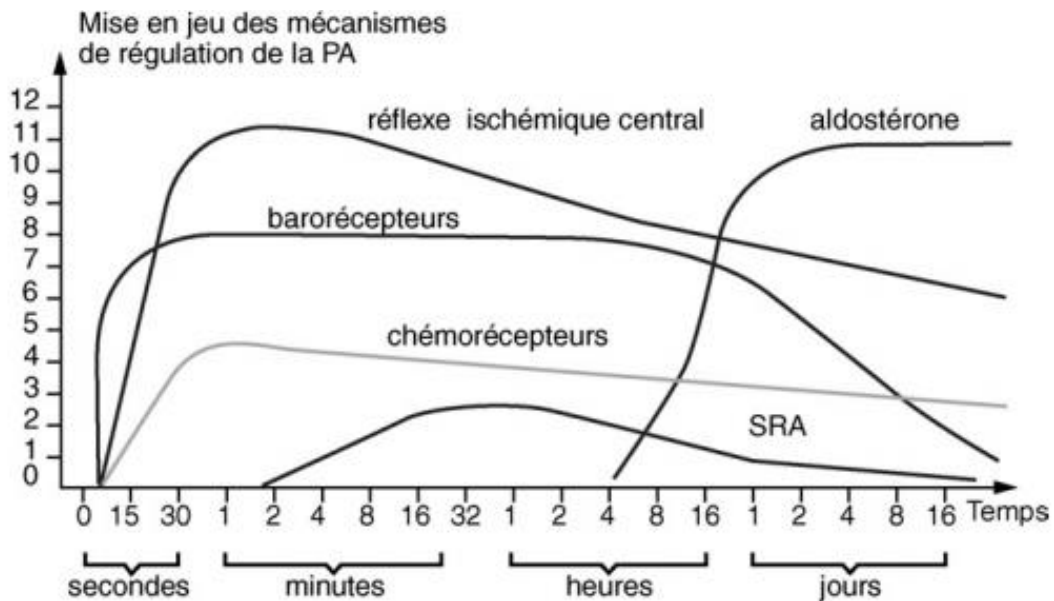


Figure 6 : Mécanismes de régulation de la pression artérielle (PA).

SRA : système rénine–angiotensine ; PA : pression artérielle. Issus de Asmar et al., 2007 (Asmar, 2007)

1.3.2.6 La modulation du baroréflexe

Cet arc réflexe discuté précédemment fait intervenir des récepteurs sensibles à la déformation et à l'étirement vasculaire. La transmission avec le système nerveux centrale est codée sur la base de fréquence d'émission de potentiel d'action. Cela implique que si une distension par les récepteurs au niveau de la crosse aortique ou des sinus carotidiens est détectée alors la fréquence de décharge des potentiels d'action augmentera. Cette augmentation de fréquence de décharge a pour effet l'augmentation de l'activité parasympathique (cholinergique) tout en limitant l'activité sympathique (catécholaminergique), de plus l'activité vasoconstrictrice sera également inhibée, origine d'une vasodilatation. Un retour à des pressions normales aura pour effet de normaliser l'activité para-/sympathique et donc d'inhiber l'activité vasodilatatrice. A l'inverse une diminution une diminution de la fréquence de décharge de potentiels d'action tend à augmenter l'activité sympathique et à freiner le parasympathique. Ce qui résulte en une vasoconstriction en faveur d'une augmentation des pressions artérielles.

1.3.2.7 L'activité catécholaminergique

Les catécholamines sont des médiateurs regroupant les 3 molécules dérivées d'une phényléthylamine oxydés et qui agissent sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) adrénergique ou dopaminergique. Ces médiateurs sont d'abord endogènes puis de synthèses. L'action catécholaminergique peut être direct ou indirect et est bien souvent cardio-vasoactive, centrale, digestive et rénale. Nous discuterons ici principalement de la modulation de l'activité des récepteurs adrénergiques.

Les récepteurs adrénergiques (AR) sont des récepteurs couplés aux protéines G que l'on peut subdiviser en plusieurs familles et sous familles :

- La famille des récepteurs β adrénergiques ou β -AR est composée de 3 sous familles : β_1 -AR, β_2 -AR, β_3 -AR
- La famille des récepteurs α -AR, composée de 2 sous familles : α_1 -AR, α_2 -AR

1.3.2.7.1 Les récepteurs β -Adrénergique

Le système β -adrénergique est acteur majeur de la régulation cardiovasculaire. Les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR ont été les premiers découverts, et c'est seulement en 1989 que le récepteur β_3 -AR a été mis en évidence (Emorine et al., 1989). L'étude des récepteurs β -AR a suscité beaucoup d'intérêt du fait de leur pertinence clinique dans le traitement de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Les récepteurs β -AR jouent un rôle sur la force de contraction du cœur (effet inotrope), sur la FC (effet chronotrope), sur la relaxation du cœur (effet lusitrope), sur la conduction cardiaque (effet dromotrope) et sur l'excitabilité cardiaque (effet bathmotrope) et au niveau vasculaire vont impacter la contractilité des cellules musculaire lisse (Woo and Xiao, 2012).

Le récepteur β_1 -AR est prédominant dans les cardiomyocytes et plus rarement retrouvé sur le lit vasculaire. Il est couplé à une protéine G stimulatrice (Gs) qui est responsable de l'activation de l'Adénylate cyclase (AC) qui va catalyser la formation de l'AMPc. L'activation de la PKA consécutive à l'augmentation des concentrations en AMPc va favoriser la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la fonction cardiaque

et vasculaire. L'expression prédominante du récepteur β_1 -AR dans le myocarde va induire des effets inotropes, lusitropes, chronotropes, dromotropes et bathmotropes positifs respectivement (Alhayek and Preuss, 2021).

Le récepteur β_2 -AR est, quant à lui, exprimé majoritairement au niveau des léiomyocytes vasculaire. En plus d'un couplage avec une protéine Gs, ce type de récepteur est aussi décrit comme couplé à une protéine G inhibitrice (Gi). L'activation de la protéine Gi contrebalance les effets stimulants de la protéine Gs par l'activation de la voie IP3 kinase (PI3K) - Akt. Au niveau vasculaire et bronchique l'activation des β_2 -AR induit une relaxation des léiomyocytes et donc une vasorelaxation ou une bronchodilatation (Abosamak and Shahin, 2021, p. 2; Woo and Xiao, 2012).

L'expression du récepteur β_3 -AR, initialement découvert en 1989, n'est décrite qu'à partir de 1996 au niveau des cellules cardiaques (Gauthier et al., 1996). Il est également retrouvé au niveau des cellules atriales, des cardiomyocytes ventriculaires, des cellules endothéliales et des artères coronaires de résistance.

Ce récepteur a des effets opposés au β_1 -AR au niveau cardiaque, à savoir un effet inotrope et lusitrope négatif. Au niveau des vaisseaux, le récepteur β_3 -AR a un effet vasodilatateur (Gauthier et al., 1998). L'activation du récepteur induit une activation de NOS, principalement eNOS et nNOS, afin d'activer la production du $\bullet$ NO. Le récepteur β_3 -AR est couplé à une protéine Gi au niveau cardiaque (Figure 30). L'activation de cette protéine Gi ne semble pas être responsable d'une inhibition de la production de l'AMPc mais plutôt une activation de la voie du $\bullet$ NO (Brixius et al., 2004; Trappanese et al., 2015).

1.3.2.7.2 Les récepteurs α -Adrénergique

Les récepteurs α -AR sont subdivisés en 2 sous types, α_1 -AR et α_2 -AR, dont la localisation et l'action diffèrent (McGrath, 2015). Les α_1 -AR sont localisés en post-synaptique principalement au niveau des cellules musculaires lisses vasculaire, intestinaux, vésical, du muscle dilatateur de la pupille, des muscles pilomoteurs. Chez l'Homme, la présence de α_1 -AR au niveau cardiaque est très faible. Au niveau vasculaire sa stimulation entraîne l'activation de la PLC, donc une augmentation d'IP3 responsable du relargage de Ca^{2+} cytoplasmique qui aboutit à une augmentation de la contractilité de la cellule et donc

d'une vasoconstriction. Ces cibles sont particulièrement intéressantes lorsque l'on souhaite moduler la réponse contractile vasculaire sans impacter la fonction cardiaque directement.

Les récepteurs α_2 adrénergiques (α_2 -AR) sont eux localisés majoritairement en présynaptiques et sont les récepteurs adrénergiques les plus représentés dans le système nerveux central. Leur répartition postsynaptique est centrale, plaquettaire (pro-agrégation), adipocytaire (pro-lipolyse) et, bien que rare, on les retrouve aussi au niveau musculaire lisse vasculaire (McGrath, 2015). L'action présynaptique prédominante permet un rétrocontrôle négatif au niveau présynaptique sur le relargage de noradrénaline. Cette dernière verra sa concentration augmentée au sein de l'espace présynaptique et pouvoir se fixer aux α_2 -AR et les activer. Les α_2 -AR sont couplés à des protéines G_i dont l'activité inhibitrice de la voie de l'AMPc en présynaptique à l'origine de l'inhibition du relargage de noradrénaline dans la fente synaptique. Cela aura pour conséquence une diminution du tonus sympathique et donc des pressions artérielles et de la fréquence cardiaque. On associe également à l'activation α_2 -AR une diminution de la sécrétion d'insuline par les îlots β pancréatique, une stimulation de l'agrégation plaquettaire et une diminution de la sécrétion de rénine. Au niveau central leur activation est à l'origine d'une sédation, de la réduction de la sécrétion de glandes exocrines, notamment salivaires.

1.3.2.7.3 Agonistes et antagonistes des récepteurs adrénergiques

Les agonistes des récepteurs aux catécholamines endogènes sont tous issus de la phényléthanolamine :

- La dopamine, agissant comme un neurotransmetteur, est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine mais est surtout le précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline
- L'adrénaline, agissant comme un neurotransmetteur et neuromodulateur, est libérée par les neurones et par la glande médullosurrénale
- La noradrénaline, agissant comme un neurotransmetteur, est libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques

Il existe une grande liste d'agonistes adrénergiques choisis principalement pour leurs différentes affinités et sélectivité pour les différents récepteurs (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Principaux Agonistes adrénergiques et leurs cibles/effets

		Cardiaque				Vasculaire		
Produit	Effet	Doses µg/kg/min	Contractilité ventricules/oreillettes β1-AR/β2-AR et α1-AR	Fréquence β1-AR	Conduction / Troubles du rythme β1-AR	Dilatation β2-AR	Constriction α1-AR et α2-AR	Vasodilatation α2-AR
Catécholamines endogènes								
Adrénaline	Direct	0,1 – 5 (β → α)	5+	4+	4+	2+	2+ à 5+	0
Noradrénaline	Direct	0,1 – 5 (β → α)	2+ à 3+	5+	4+	0 à +	6+	0
Dopamine	Direct	3 → 40	3+	3+	3+	2+	0 – 4+	0
	Indirect	DA → β → α						
Catécholamines et sympathomimétiques de synthèses								
Isoprénaline	Direct	0,01 → 1	6+	5+	6+	6+	0	0
Dobutamine	Direct	3 → 25	4+	2+	3+	+ à 2+	0 à (>15 µg/kg/min)	0
Dopexamine	Direct	0,5 → 6	0 à +	0 à +	0 à +	2+	0	0
Catécholamines et sympathomimétiques non catécholaminergiques								
Ephédrine	Direct/Indirect							
Phényléphrine	Direct		0	0	0	0	5+	1+
Guanabenz	Direct		0	0	0	0	1+	5+
Dexmedetomidine	Direct		0	0	0	0	1+	4+

1.3.2.7.4 Régulation des pressions artérielles par le système rénal

La régulation impactant la modulation du volume circulant et l'osmolalité joue un rôle central dans la régulation des pressions artérielles et du Qc. Le rein joue un rôle particulièrement important via le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) (Fountain and Lappin, 2021). La rénine, sécrétée par les cellules granulaires de l'appareil juxtaglomérulaire est une enzyme qui permet le clivage de l'angiotensinogène synthétisé par le foie en angiotensine I. L'hydrolyse par l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) permet l'obtention de l'angiotensine II (AT2), octapeptide vasoconstricteur. L'ACE va inhiber l'action de peptides vasodilatateurs tels que la bradykinine. L'AT2 induit une vasoconstriction puissante et stimule la formation d'aldostérone qui favorise la réabsorption hydrosodée. A l'inverse, s'il y a une augmentation de PAM importante et soutenue, le débit de filtration des capillaires systémiques augmente, provoquant une vasodilatation artériolaire (relaxation de contrainte). De nombreux autres mécanismes peuvent-être impliqués :

La diminution des pressions artériolaire afférente implique une perte de tension de la paroi ce qui a pour effet de stimuler les cellules granulaires

- L'activation des barorécepteurs carotidiens et aortiques favorise l'action du système nerveux sympathique dont les voies nerveuses se projette sur les cellules granulaires provoquent une augmentation de la sécrétion de rénine
- La diminution du débit de filtration glomérulaire et donc du débit au niveau du tubule contourné distal est captée par les cellules de la *macula densa* sécrétrices des agents paracrines, responsables du feedback tubulo-glomérulaire, stimulant la production de rénine

Par ailleurs, la libération de rénine est inhibée par le peptide auriculaire natriurétique ou ANP en réponse à une augmentation de la pression artérielle ou par l'angiotensine II et l'aldostérone (Almeida et al., 2020).

1.3.2.7.5 Le monoxyde d'azote

Le $\cdot\text{NO}$ est une espèce radicalaire composée d'un atome d'azote lié à un atome d'oxygène avec un temps de demi-vie de l'ordre de quelques secondes. Sa production se fait principalement au niveau de la cellule endothéliale (Kumar et al., 2020). La propriété liposoluble de ce gaz lui permet de diffuser à travers les membranes plasmiques. Une fois synthétisé, le $\cdot\text{NO}$ diffuse donc rapidement vers l'extérieur de la cellule. Le $\cdot\text{NO}$ induit la relaxation des cellules musculaires lisses (vasorelaxant) et son activité anti-agrégative et anti adhérente plaquettaire par l'activation des guanylate cyclase solubles (GCs). L'augmentation du GMPc consécutive permet l'activation des protéines kinase G (PKG). L'activation de la voie GC/GMPc/PKG a des effets dépendants de la concentration en $\cdot\text{NO}$ au niveau cardiaque :

- Faibles concentrations : effet inotrope positif
- Concentrations importantes : effet inotrope négatif

Pour résumer, l'augmentation de la production du $\cdot\text{NO}$ aura un effet vasorelaxant plutôt en faveur d'une diminution de la pression artérielle et un effet sur la contractilité cardiaque dépendant de la concentration locale (Infante et al., 2021).

1.3.3 Implications en physiopathologies

Si l'intégration de ces mécanismes permet la régulation du débit cardiaque et de sa répartition aux organes à une pression constante, l'atteinte des systèmes de régulation peut notamment se traduire chez le patient par la genèse d'une insuffisance circulatoire, cardiaque ou de différents organes.

Celle-ci est définie par l'incapacité de l'organisme à maintenir une fonction hémodynamique essentielle pour assurer une perfusion adaptée des organes. Les origines peuvent être multiple :

- Insuffisance cardiaque : incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe et donc de générer un Qc suffisant (Hajouli and Ludhwani, 2021).

- Défaillance ou instabilité hémodynamique : incapacité de maintenir et réguler des pressions artérielles suffisantes
- Etats de chocs : d'origines septiques, traumatiques, anaphylactiques, cardiogéniques, hypovolémique. Sont définies comme une défaillance du système circulatoire, aboutissant à une inadéquation entre l'apport et les besoins tissulaires périphériques en oxygène.

Ces dysfonctions engagent le pronostic vital du patient et doivent-être traités rapidement. Les principales prises en charges sont : le contrôle de la source et le traitement symptomatique. Ils peuvent être chirurgicaux, pharmacologiques et/ou mécanique. La combinaison de cet arsenal thérapeutique peut être privilégié afin de maintenir des paramètres hémodynamiques optimaux sinon suffisants à la survie et à la prise en charge à plus long terme du patient.

Les traitements chirurgicaux visent à rétablir la fonction initiale du ou des organes touchés ou de remplacer ces éléments (greffes cardiaques, pulmonaires, vasculaires, valvulaires, pontages coronariens, plasties, exérèses par exemple).

Les traitements pharmacologiques exploitent les mécanismes de régulations de l'hémodynamique (catécholamines, donneurs de monoxyde d'azote, vasopresseurs ou dilatateurs, diurétiques/antidiurétiques par exemple).

Enfin, les assistances circulatoires mécaniques peuvent être mises en place afin de suppléer voire remplacer la fonction des organes.

1.4 L'assistance circulatoire mécanique

Les dispositifs d'assistances circulatoires mécaniques ou DACM sont définies comme l'ensemble des moyens thérapeutiques de suppléance de la fonction circulatoire, ventriculaire gauche, droite ou du cœur entier avec le but d'assurer les fonctions hémodynamiques essentielles (Akhmerov and Ramzy, 2021; McNamara et al., 2021; Molina et al., 2021). A noter que quelques DACM permettent également la suppléance, exclusive ou non, de la fonction pulmonaire.

Ces assistances sont ainsi mobilisées dans un contexte de soins critiques dans 3 grandes indications que sont 1) l'attente de transplantation, 2) l'attente de récupération des fonctions d'organes suppléées ou 3) la suppléance de longue durée voire définitive (Arora et al., 2021; Takatani and Sakamoto, 2000). Les indications les plus fréquentes sont :

- Réanimation cardiopulmonaire pour les arrêts cardiaques réfractaires
- Insuffisances circulatoires, définie l'inadéquation entre les apports en oxygènes et les besoins tissulaires
- États de chocs d'origines principalement cardiogéniques, septiques, traumatiques ou de brûlures étendues
- Insuffisance cardiaque, définie par la fédération française de cardiologie comme étant une incapacité de la pompe cardiaque d'assumer ses fonctions essentielles
- Lors d'insuffisance respiratoire aigue
- Lors d'intervention chirurgicales complexes, longues et/ou touchant la fonction cardiaque, vasculaire et ou respiratoire (greffes, chirurgies cardiaques).

Plus récemment encore le transport de patients par voie aérienne ou routière (Unité mobile d'assistance circulatoire ou UMAC) a pu être permis uniquement grâce au développement de ces assistances circulatoires et la formation d'équipe soignantes spécialisées.

Les DACM peuvent-être séparées en 2 grands groupes que sont les suppléances circulatoires implantables ou extracorporelles (**Tableau 3**). Chaque DACM est adapté au patient, à un besoin et une indication particulière dépendant par exemple : de la fonction respiratoire, cardiaque et vasculaire mais aussi des antécédents du patient. Enfin la combinaison de plusieurs DACM peut être évaluée comme bénéfique dans certains cas (Assistances gauches et assistances droites temporaires, assistances gauche définitives et assistances droites temporaires par exemple) (Atkinson et al., 2016).

Tableau 4 : Exemples de DACM, de leurs utilisations et particularités.

Adapté de Atkinson et al., 2016, Jefferson et al., 2021 (Atkinson et al., 2016; Jefferson et al., 2021)

	Contre pulsion (IABP)	Impella (2,5, CP, 5)	HeartMate - Jarvik	TandemHeart	ECMO Veino-Artériel	Bypass Cardio Pulmonaire (CEC)
But	Décharge du VG	Décharge du VG	Décharge du VG	Décharge de l'OG	Remplacement complet à suppléance hémodynamique et respiratoire	suppléance hémodynamique et respiratoire
Position	Externe -Aorte	Externe - Trans valve Aortique	Implantable - Abdominale	Externe	Externe	Externe
Mécanisme	Pompe pneumatique - Effet de succion	Vis hélicoïdale-axiale	Pompe centrifuge	Pompe pneumatique	Pompe centrifuge	Pompe occlusive
Débit cardiaque	0,3-0,5 L/min	1-5 L/min	5-10 L/min	2,5-5 L/min	3-10 L/min	3-10 L/min
Effet Sur la precharge	↓↓	→	→	→	↑↑↑	↓↑→
Effet Sur la postcharge	↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
Perfusion coronaire	↑↑					
Récupération et restitution du sang	Aortique	Décharge VG dans l'aorte	Ventricule vers Vaisseaux éfferents	Oreillette gauche dans l'aorte	Oreillette droite dans l'aorte	Oreillette droite dans l'aorte
Temps d'implantation maximum	Semaine(s)	7 jours	Longue	14 jours	Semaine(s)	< Jours
Abords chirurgicaux	Fémoral	Fémoral	Thoracique	Fémoral	Fémoral/Carotide/Jugulaire/Central	Thoracique (thoracotomie mini-invasive ou sternotomie)
Nécessite une activité cardiaque synchrone/stable	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
Anticoagulation nécessaire	Faible	Moderée	Importante	Moderée	Moderée	Importante
Hémolyse consécutive	Faible	Moderée	Moderée	Moderée	Moderée	Importante

1.4.1 Suppléance cardiaque et cardio-pulmonaire

1.4.1.1 Suppléance circulatoire implantable

La miniaturisation récente des DACM a permis une implantation plus ou moins complète chez les patients qui nécessitent respectivement des assistances de courtes et de longues durées (Arora et al., 2021). L'implantation de DACM permet au patient de récupérer ainsi une qualité de vie supérieure. Si de très nombreux DACM implantables existent actuellement, les fonctions suppléées sont souvent les mêmes (**Tableau 4**) en exploitant différents mécanismes et différents abords avec des objectifs différents. Les principales fonctions ici sont de remplacer ou d'aider le fonctionnement d'un ventricule, des deux, voire d'un ou 2 héli-cœurs, nous parlons ici de dispositif d'assistance ventriculaire. Le dispositif implantable le plus utilisé actuellement est le ballon de contre pulsion intra aortique (IABP) (Hetzer et al., 2021). Depuis quelques années des prothèses cardiaques ont pu être également mise au point (Définitive : Carmat, CardioWest, HeartMate II et III, Heartware ou temporaire : Impella, ...).

1.4.1.1.1 Ballon de Contre pulsion intra aortique

Son implantation est périphérique : le dispositif est remonté depuis l'artère fémorale dans l'aorte descendante au-dessous de l'artère sous clavière gauche. Le ballonnet placé dans l'aorte va se gonfler en fin de systole, à la fermeture de la valve aortique, induisant une augmentation de la pression aortique au cours de la diastole. Enfin ce ballonnet est dégonflé en début de systole réduisant la pression aortique lors de l'éjection du sang par le ventricule (González and Chaney, 2020). Cette procédure permet :

- L'amélioration de la perfusion coronaire par l'augmentation de la pression aortique diastolique
- La diminution de la résistance contre laquelle le cœur lutte lors de l'éjection par la diminution de la pression artérielle systolique et donc d'améliorer le travail cardiaque et donc de diminuer sa consommation en O₂.

1.4.1.1.2 Assistances Ventriculaires

Ces assistances sont composées de matériaux choisis pour être les mieux tolérés notamment au niveau sanguin (Jefferson et al., 2021). Le principe ici est de favoriser une décharge d'un ventricule ou d'une oreillette dans le compartiment d'arrivée. Pour cela il existe plusieurs moyens, par exemple :

- Le sang est pompé par la canule d'entrée située dans une oreillette ou dans un ventricule et redistribué par la canule de sortie pulmonaire ou aortique à un débit imposé par la pompe.
- Le sang est propulsé du ventricule vers l'aorte par une vis d'Archimède au travers d'une valve

Ces DACM sont adaptés en fonction de la durée de suppléance souhaitée, allant de quelques jours à plusieurs semaines, et du débit à atteindre. Le couplage de 2 DACM peut être envisagé dans certains cas. Nous pouvons classer ces DACM selon la durée d'assistance pour laquelle elles seront préconisées (Jefferson et al., 2021):

- Temporaire : Thoratec CentriMag, Impella, TandemHeart...
- Long terme : Thoratec Heartmate, Berlin heart, Abiomed AB5000, Heart Assist, Jarvik 2000, HeartWare...

1.4.1.2 Suppléance circulatoire extracorporelle

1.4.1.2.1 Généralités

Ces assistances circulatoires extracorporelles sont des options DACM invasives qui ont pour fonction de remplacer tout ou partie de la fonction cardiaque et pulmonaire. Historiquement, ces techniques ont été développées lors de la 2ème moitié du 20ème siècle en même temps que la chirurgie cardiaque. Les preuves de concepts ont été marquées par quelques grandes dates et événements :

- En 1812, Jean-Jacques Le Gallois introduit le concept de circulation extracorporelle et d'organes isolés et publie un essai sur la mécanique cardiaque et respiratoire
- En 1868-1869 et 1880, le premier oxygénateur est créé dans le but d'oxygéner du sang extracorporel. Il consiste d'abord en un ballon sous agitation (Ludwig et Schmidt) puis par bullage : l'air traverse sous forme de bulles le sang veineux.
- En 1885, c'est von Frey et Gruber qui conceptualise la première machine cœur-poumons
- En 1916, la découverte de l'héparine permet d'envisager la réduction d'accident thrombotique.
- En 1937, Gibbon démontre que son dispositif "cœur-poumon" artificiel peut assurer totalement les fonctions du cœur et du poumon d'un chat tandis que l'artère pulmonaire de celui-ci est clampée.
- En 1953, une chirurgie chez l'enfant par le Dr Walton dans le Minnesota avec un système de circulation croisée : la circulation de la mère et de l'enfant se trouvait relié par une tubulure, permettant la suppléance circulatoire chez l'enfant. Cette même année la première machine de circulation extracorporelle est mise au point. Son invention peut être attribuée à Gibbon à Philadelphie.
- En 1963, le premier cœur artificiel partiel est implanté chez l'Homme par Liotta
- En 1967, Barnard réussit la première greffe cardiaque
- En 1969, avec l'implantation d'un cœur artificiel total par Cooley chez un Homme de 47 ans en attente de transplantation

Par la suite, la CEC a été utilisée dans le cadre de chirurgies thoraciques mais également pour suppléer une fonction cardiaque et notamment ventriculaire par des systèmes plus ou moins miniaturisés. Pour autant, jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle la complexité de la mise en œuvre au niveau procédure, le suivi et le besoin matériel et humain rendait exceptionnelle ce genre de thérapeutique (Bartlett, 2005; Sangalli et al., 2014).

On peut compter plusieurs types assistances extracorporelles qui sont les circulations extracorporelles ou CEC, *cardiopulmonary bypass* pour les anglo-saxons, et la circulation extracorporelle avec oxygénateur à membranes ou « *Extracorporeal Circulation Membrane Oxygenation* » (ECMO). Toutes les assistances circulatoires extracorporelles permettant à la fois la suppléance des poumons et du cœur sont dénommés ECLS (*extracorporeal life support*). Ces assistances partagent le principe de DACM type Thoratec, HeartMateII et HeartMateIII : récupérer le sang d'un compartiment, cardiaque ou vasculaire, par une canule prolongée par une tubulure pour le redistribuer vers un autre compartiment à un débit imposé par une pompe extracorporelle. La différence principale est ici la taille du circuit utilisé, l'implantation des canules, les éléments additionnels sur le circuit :

- Echangeurs thermiques afin de maintenir le sang à une température voulue
- Oxygénateur à membrane
- Monitoring de la gazométrie, des électrolytes et métabolites, débitmètre et capteurs de pressions
- Possibilité d'ajouter des filtres, des membranes de dialyses, des filtres d'exclusions (gaz ou molécules), des shunts de circuit

Les CEC nécessitent une purge et un remplissage préalable des circuits ou « *priming* » par des solutés de perfusions colloïde ou cristalloïde. Le soluté balancé le plus utilisé est le Ringer lactate (RL) que l'on retrouve parfois mélangé à un colloïde comme la gélatine fluide modifiée ou hydroxy-éthyle-amidon ou de produits dérivés du sang (culots globulaires, plasma, plaquettes). Lors de la CEC des substances pharmacologiques peuvent être ajouté directement au circuit ou au *priming* (anti-coagulant, anti-fibrinolytiques, vasoconstricteurs par exemple).

Ce volume de priming va se « mélanger » avec le sang du patient lors de la CEC et donc le diluer. Il s'agit de l'hémodilution et est caractérisée par une diminution de l'hématocrite. Elle sera d'autant plus forte que le volume mort, la taille du circuit et donc le volume du priming seront importants.

1.4.1.2.2 Extracorporeal Circulation Membrane Oxygenation

La circulation extracorporelle avec oxygénateur à membrane a tout d'abord permis la suppléance de la fonction pulmonaire en utilisant une membrane servant de surface d'échanges gazeux externe (membrane d'oxygénation ou oxygénateur) (Pujara et al., 2015). Ainsi, la membrane séparant le sang circulant et les gaz permettra l'oxygénation et la décarboxylation du sang. L'ECMO est maintenant devenue également une assistance cardiorespiratoire assurant hématose et perfusion des organes en attendant la restauration de leurs fonctions. Cette technique d'assistance peut être centrale ou périphérique. Le circuit comprend une pompe centrifuge, la plupart du temps non occlusive, un oxygénateur et des canules de drainage et de réinjection (Combes et al., 2009).

La mise en place d'une ECMO par voie percutanée permet l'initiation rapide au lit du malade voire en extrahospitalier.

L'ECMO se voit disponible sous 2 configurations :

L'ECMO VA, ou veino-artérielle, consiste à suppléer et/ou remplacer à la fois le cœur et les poumons de manière partielle ou totale (**Figure 7**). Une canule veineuse située dans l'oreillette droite, implantée soit par voie périphérique (veine fémorale), soit par voie plus directe (implantation centrale), aspire le sang désoxygéné par l'intermédiaire d'une pompe centrifuge extracorporelle non occlusive. La pompe transmet le sang veineux à travers un oxygénateur et restitue le sang oxygéné au patient par une canule artérielle qui peut être périphérique (artère fémorale ou axillaire) ou implantée directement sur l'aorte ascendante (implantation centrale). Les abords périphériques ont l'avantage de pouvoir s'implanter par voie percutanée (les abords fémoraux). L'objectif de l'ECMO veino-artérielle est d'assurer un débit entre 2,5 à 6-7 L/min/m², soit l'équivalent du débit propre du patient (70 mL/kg), et de maintenir une SaO₂ > 95 % et une SvO₂ > 70 %.

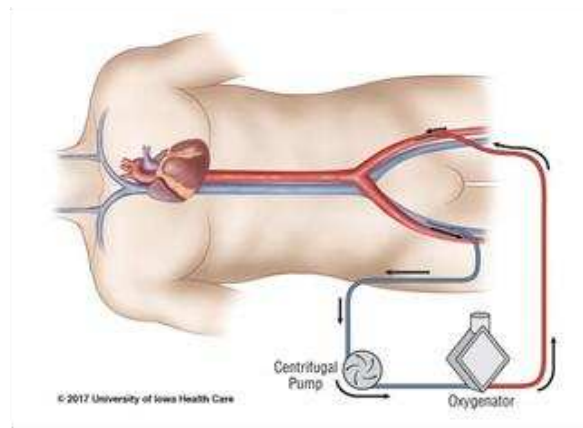


Figure 7 : Schéma d'un montage ECMO artérioveineux fémoro-fémoral

ECMO-VA, ou ECMO artérioveineuse : circulation extracorporelle permettant un support respiratoire et hémodynamique. Ici la récupération de sang veineux est effectuée par la canule fémorale droite, il est oxygéné par la membrane d'oxygénation située après la pompe et est réinjecté dans l'artère fémorale gauche.

La VV-ECMO, ou ECMO veino-veineuse, permet la suppléance de la fonction respiratoire sans suppléance hémodynamique (**Figure 8**). Ici les canules sont implantées comme précédemment en position périphérique ou centrale mais cette fois uniquement dans des compartiments veineux. Cette ECMO est placée classiquement par voie fémoro-jugulaire, la canule de drainage récupérant le sang de la veine cave inférieure depuis la veine fémorale et grâce à la pompe le sang oxygéné est redistribué en regard de l'oreillette droite par la canule jugulaire. Il est également possible de retrouver des ECMO-VV exploitant les abords des 2 veines fémorales (fémoro-fémorale), avec une canule de drainage au niveau du carrefour cave et une autre canule pour la réinjection au niveau de l'oreillette droite (Ficial et al., 2021; Sangalli et al., 2014). Plus récemment un abord unique a pu être envisagé par le développement de nouvelles canules (Avalon par exemple) (Ellis et al., 2019; Wang et al., 2019). Ce nouveau type de canules permet par ses 2 lumières à la fois le drainage du sang et sa réinjection à travers des orifices de canules distants.

L'objectif est d'assurer un débit de $2,5-5 \text{ L/min/m}^2$, en se contentant d'une $\text{SaO}_2 > 80 \%$ et d'une $\text{SvO}_2 > 70 \%$, sachant que le débit propre du patient hypoxémique se mélangera au sang oxygéné par l'ECMO. L'efficacité de l'ECMO dépendra du rapport entre le débit de sang oxygéné apporté par l'ECMO et le débit de sang pauvrement oxygéné restant.

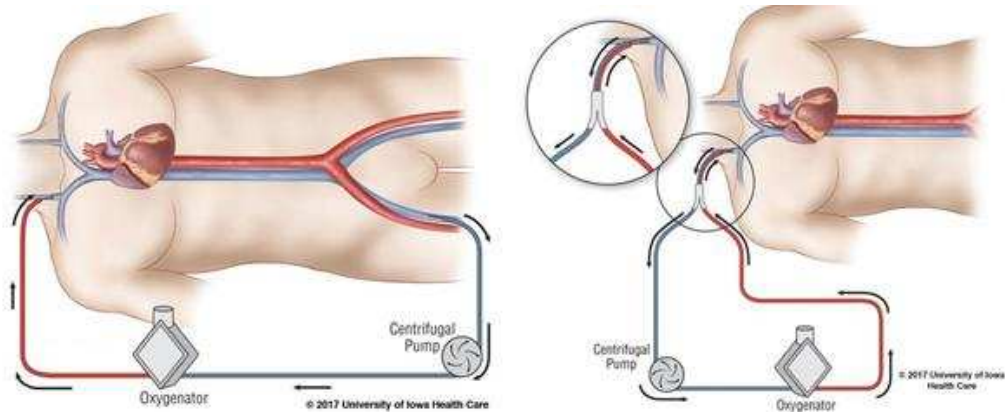


Figure 8 : Schéma d'un montage ECMO veino-veineux.

ECMO-VV, ou ECMO veino-veineuse : circulation extracorporelle permettant un support respiratoire. Ici le prélèvement de sang veineux est effectué par la canule insérée, canule d'admission, dans la fémorale droite (à gauche) ou jugulaire (à droite). Le sang est oxygéné par la membrane d'oxygénation située après la pompe et est réinjectée par la canule jugulaire.

1.4.1.2.3 By-pass Cardio-pulmonaire

L'objectif de cette CEC est de pouvoir remplacer la fonction cardiaque et pulmonaire au cours d'une chirurgie cardiaque permettant au chirurgien de décharger les cavités cardiaques et de travailler sur un cœur arrêté et ouvert (Hessel and Groom, 2020; Sarkar and Prabhu, 2017). L'abord de cette CEC nécessite une ouverture de la cavité thoracique par sternotomie ou thoracotomie. La mise en évidence de l'aorte permet le clampage de l'aorte en amont de la canule de reperfusion afin de ne pas avoir de retour sanguin vers le cœur lors de la CEC. Cela permet aussi au chirurgien d'introduire une canule dans l'aorte ascendante

qui servira à perfuser exclusivement le cœur par ses coronaires avec une solution de cardioplégie, permettant l'arrêt de la fonction cardiaque.

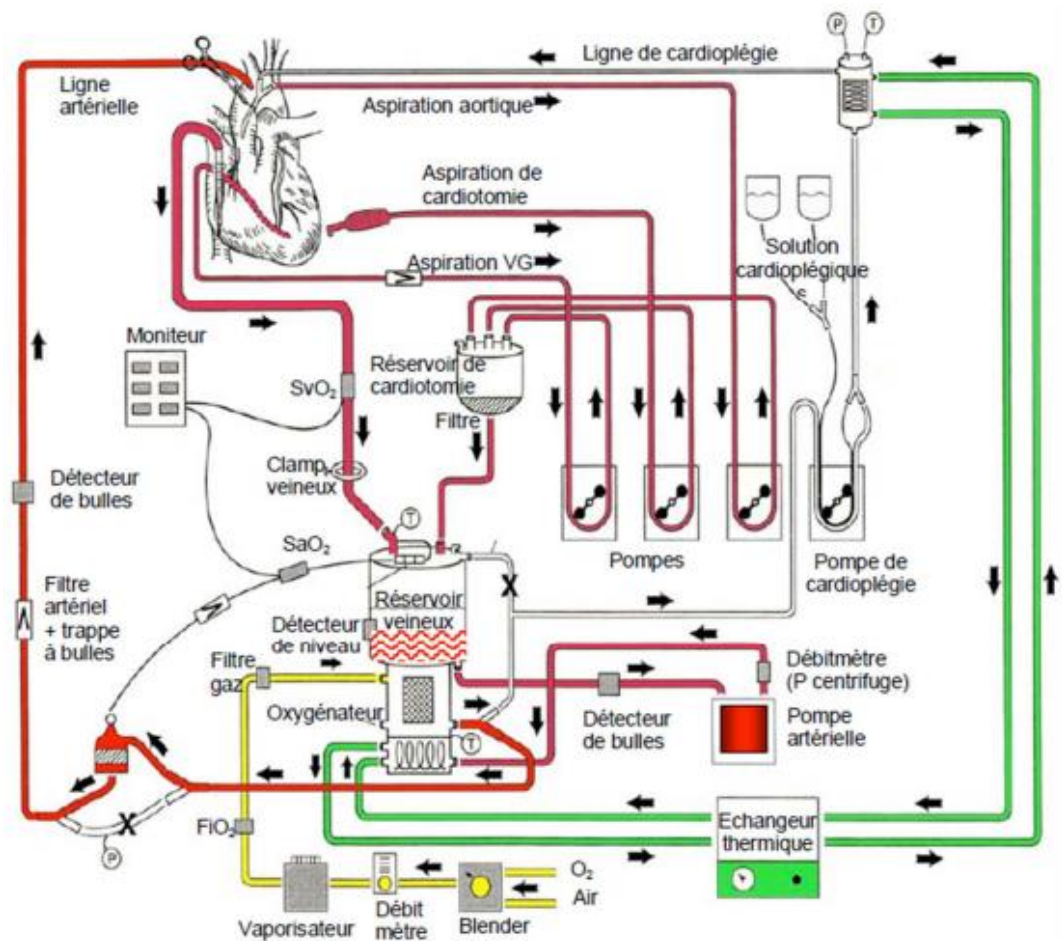


Figure 9 : Schéma de montage de bypass cardiopulmonaire.

Adapté de Gravlee GP, ed. Cardiopulmonary bypass: principles and practice, 2nd edition. Philadelphia : Lippincott, Williams & Wilkins, 2000, p 70)

Le circuit (**Figure 9**) est complexe mais les éléments principaux sont les suivants :

- Une à deux canules multi perforées insérées dans l'oreillette droite ou les veines caves supérieures et inférieures pour le drainage du sang veineux dans une tubulure puis dans un réservoir veineux. Ce drainage est possible par gravité, en effet le réservoir veineux situé plus bas que le patient impose une différence de pression. Il est possible d'adjoindre une aide mécanique avec une pompe pour augmenter le drainage veineux s'il s'avère insuffisant

- Une pompe principale, généralement péristaltique, à galets (occlusive) placée entre le réservoir veineux et l'oxygénateur
- Un oxygénateur à membrane pouvant être associé un évaporateur d'anesthésiant halogéné (sévoflurane ou plus rarement isoflurane) et un débitmètre air-oxygène afin d'administrer précisément la quantité du mélange
- Un échangeur thermique permettant de maintenir le sang à 36-37°C ou de réchauffer ou refroidir progressivement le sang
- Un circuit artériel conduisant le sang oxygéné dans l'aorte après le clamp aortique

Des éléments sur des circuits secondaires sont ajoutées également :

- Un ou plusieurs circuits d'aspiration chirurgicale (de cardiectomie, du champ opératoire, des saignements excessifs) associée à des pompes d'aspirations afin de récupérer le sang dans le réservoir veineux
- Un filtre artériel permettant d'épurer le sang de particules de gros calibres (>50 µm) et d'éventuelles bulles d'airs
- Des systèmes de monitoring en ligne (pressions, gazométrie, pH, débits, électrolytes, températures).

1.4.2 Physiopathologie et objectifs thérapeutiques d'une CEC

1.4.2.1 Généralités

L'incision thoracique, cardiaque et vasculaire, le contact du sang avec les surfaces non biologiques, l'écrasement par l'action des pompes péristaltiques, la possible hypothermie, ainsi que le syndrome d'ischémie-reperfusion induisent une agression systémique. Il en résulte une activation des systèmes plaquettaire, de la coagulation, du système kinine-kallikréine et du système immunitaire ainsi que de l'endothélium. L'ensemble participe à la survenue et à l'entretien d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SRIS.

Tous les éléments cités précédemment forment un syndrome complexe qui peut être à l'origine de la survenue d'événements indésirables comme une hypotension artérielle, une défaillance d'organe simple ou multiple. L'importance et la durée de l'agression tissulaire va dépendre non seulement de l'état du patient en pré-opératoire, des comorbidités présentées, des traitements préalables et de variables individuelles telles que les prédispositions génétiques mais aussi du type de chirurgie ainsi que de la durée de CEC et de clampage aortique (ischémie myocardique).

Il est logique de considérer qu'une chirurgie courte comme un remplacement valvulaire aortique avec une durée de CEC et de clampage aortique courte sera moins délétère qu'une chirurgie complexe longue impliquant plusieurs procédures et la résection importante de structures (par exemple remplacement de plusieurs valves, ou chirurgies valvulaires associé à un remplacement d'une portion d'aorte ascendante).

1.4.2.2 Défaillances tissulaires

L'ensemble des conséquences directes et indirectes associées à l'utilisation des CEC, qui seront discutés dans la section suivante, peuvent aboutir à des défaillances et des dysfonctions d'un ou plusieurs organes. La survenue de ces événements indésirables sont fortement conditionnés par l'intensité des stress générés et des processus physiologiques mis en jeu pour y répondre. Les conséquences chaque patient seront alors plus ou moins diversifiées et graves. S'il existe une variabilité individuelle non négligeable et des terrains génétiques prédisposant, il existe un socle commun à l'apparition de ces défaillances qui sera

discuté par la suite. La plupart du temps, la dysfonction d'organe consécutive à une CEC sera transitoire et les mécanismes de défense mis en place permettent le rétablissement de l'homéostasie afin de rétablir un fonctionnement correct des différents organes.

Les tissus et organes les plus impactés au décours et à la suite d'une CEC sont :

- Sur le plan hématologique par (i) l'hémodilution, (ii) les coagulopathies, (iii) la possibilité d'une hémolyse ainsi que (iv) l'inflammation. Cela peut aboutir à une insuffisance de transport de l'oxygène mais aussi une diminution des pressions colloïdales exercées favorisant la fuite de liquide extravasculaire. L'administration de produits dérivés du sang (culots globulaires rouges ou plaquettes), la filtration et l'épuration du sang peuvent remédier en partie à ce problème.
- Le tissu cérébral est exposé à une inflammation importante, une régulation de la perfusion cérébrale potentiellement altérée ainsi qu'à un risque d'accident vasculaire embolique. Ces éléments sont régulièrement responsables d'une dysfonction cérébrale pouvant être importante associée à des troubles comportementaux, ou *delirium*, une dérégulation des systèmes nerveux autonomes et des arcs réflexes ainsi que des déficits moteurs ou sensitifs définitifs.
- Le rein, par l'hémodilution, l'hémolyse éventuelles, l'inflammation, des phénomènes d'ischémie/reperfusion, l'administration massive de solutés de remplissage, de transfusion et de sympathomimétiques, les changements de débits de perfusion. Les conséquences fonctionnelles et histologiques peuvent être importantes notamment par la destruction d'unités de filtrations, des nécroses des tubules contournés distaux. Les pathologies les plus fréquemment décrites dans la littérature sont décrites comme des insuffisances rénales aiguës (les *Acute Kidney Injuries* ou AKI pour les anglosaxons) qui peuvent mener à la perte de fonction rénale chez le patient.
- Le cœur, par le stress chirurgical, des lésions d'ischémies/reperfusions, la surcharge catécholaminergique, les modifications des conditions de charge

- Le poumon, par l'inflammation, l'hémodilution, les lésions d'ischémies et de reperfusions et également par les lésions provoquées par la ventilation mécanique. Cela peut conduire à une dysfonction respiratoire, des atteintes parenchymateuses à type d'œdème lésionnelle (les *Acute Lung injury*, ou ALI des anglosaxons), voire des syndromes de détresse respiratoire aiguë, une mauvaise fonction de la réactivité bronchique.

1.4.2.3 Conséquences associées aux assistances circulatoires

1.4.2.3.1 Syndrome de réponse inflammatoire systémique

La chirurgie, la CEC et son contexte induit une réponse physiologique forte immédiate qui est prolongée par une phase tardive. Cette première phase est initiée par le protocole chirurgical et l'activation inflammatoire l'activation de contacts sang/biomatériaux et sang/mélange gazeux du tissu sanguin et résulte en une activation importante des voies pro inflammatoires. L'inflammation systémique générée associée à des réponses et symptômes plus ou moins tardives définissent un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS). La réponse inflammatoire systémique est complexe, initiée par action direct ou indirect et peut être à l'origine de mortalités et morbidités significatives.

Le SRIS est défini classiquement en clinique par la présence de 2 ou plus de 2 des critères suivants :

- Hypo- ou hyperthermie : $< 36^{\circ}\text{C}$ ou $> 38^{\circ}\text{C}$
- Tachycardie : FC $> 90/\text{min}$
- Respiratoire : Fréquence respiratoire $> 20/\text{min}$ ou $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leucocytose $> 12.000/\text{mm}^3$, $< 4.000/\text{mm}^3$ ou présence de formes immatures circulantes ($> 10 \%$ des cellules)

Le SRIS va être initié puis prolongé par de nombreux mécanismes cellulaires en réponses aux différentes agressions évoquées précédemment. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les plus décrits que sont : l'activation endothélial, du complément, de la kinine, de

fibrinolyse, des voies de synthèses des cytokines et l'activation de la coagulation (**Figure 10**).

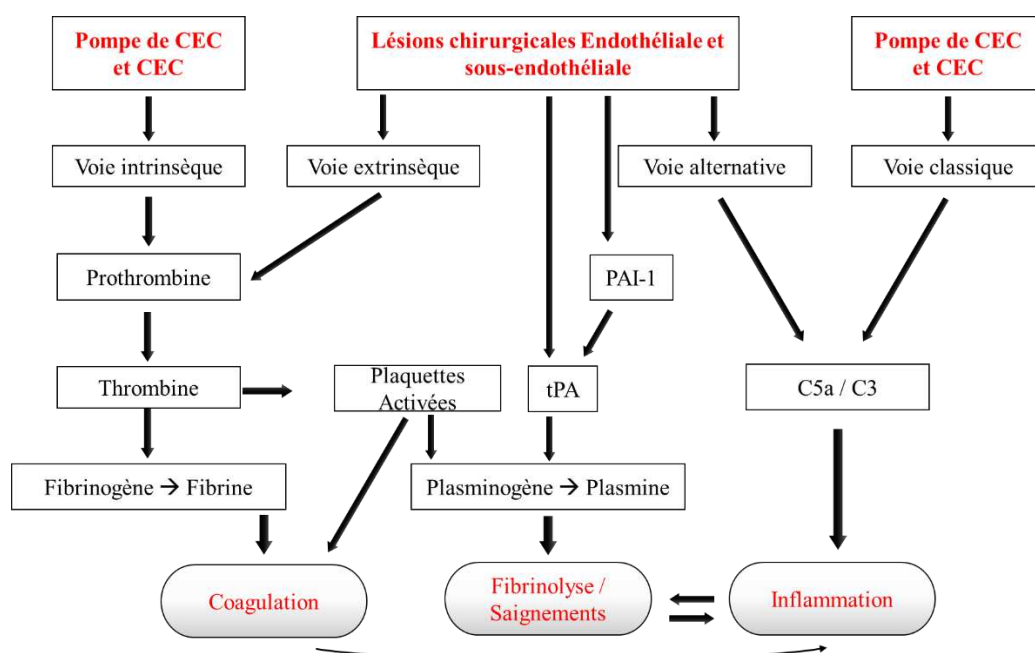


Figure 10 : Schéma récapitulatif de l'effet initial de la CEC sur le complément, et les cascades de coagulations

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor ; tPA : tissular Plasminogen activator. Adapté de Maia et collaborateurs (Maia et al., 2006)

1.4.2.3.2 Activation du système du complément

Le système du complément est un pilier de la réponse immunitaire activé selon une voie « classique » ou « alternative ». L'activation du système du complément participe à la mise en place précoce de l'inflammation et de la coagulation durant une CEC. Ce système est activé dès le début de la CEC (Bruins et al., 1997). Il s'agit d'un système complexe comprenant une quarantaine de facteurs retrouvés dans le plasma. Tous sont impliqués dans les fonctions de chemo-attraction, d'activation, d'opsonisation et de lyse. La voie classique est dépendante d'un complexe antigénique/C1 alors que la voie alternative sera initiée par la complexion direct de C3 avec sa cible : antigènes, toxines mais aussi sur des surfaces : activation par contact. Les deux voies se rejoignent rapidement pour n'en former qu'une par la protéine C3 convertase qui ira cliver la C3 en C3a. L'effet du système du complément est

médié par l'activation en cascade de protéines par clivage de pré-protéines non actives par des enzymes. Parmi les facteurs effectifs nous notons :

- C3a : stimule la libération d'histamine et médiateurs inflammatoires par les mastocytes, éosinophiles et basophiles. Les effets principaux associés est une contraction des cellules musculaire lisses (retrouvée au niveau bronchique ou vasculaire par exemple) et une augmentation de la perméabilité vasculaire.
- C5a : a une action pro-agrégant, -activatrice et -adhésive sur les neutrophiles
- C3b et C5b : permettent l'activation de plaquettes et forment un complexe d'attaque membranaire avec C6-C9 visant la lyse cellulaire

1.4.2.3.3 Coagulation

La gestion per et péri opératoire de la coagulation est essentielle dans toutes utilisations de DACM afin de prévenir autant que possible l'activation des cascades de coagulation par contact entre le sang et les surfaces non biologiques. Lors de CEC en particulier, sans anticoagulation appropriée la formation de caillots vasculaire ou dans la tubulure s'effectue dans les minutes suivants l'amorçage.

Les conséquences de ces thrombus, principalement localisés dans les vaisseaux de faibles calibres et parfois de gros calibres, peuvent aboutir à la dysfonction d'un ou plusieurs organes, de coagulation intravasculaire disséminée et mener au décès du patient.

La cascade de coagulation est la résultante de l'activation et l'interaction de différentes protéines sensibles à des stimulus tels que le contact sur des surfaces non biologiques (air, plastiques, membranes), l'inflammation ou par des composés pharmacologiques.

L'étape finale de la cascade de coagulation est la formation, par clivage du fibrinogène, de fibrines formeront un caillot en se polymérisant. La thrombine activée sert d'initiateur enzymatique de cette étape finale et est elle-même formée par la protéolyse de la prothrombine par le facteur X en présence du facteur Va, de phospholipides et de calcium.

L'initiation de l'activation de la coagulation peut se faire par les voies intrinsèques et extrinsèques qui aboutissent toutes deux à la libération de thrombine. Lors d'une CEC ces deux voies sont mises en jeu et conduisent à la formation de thrombine et donc à la production d'un caillot de fibrine. La mise en place de cette réponse à la CEC est très fortement liée à l'initiation de l'inflammation systémique et sa persistance post-opératoire.

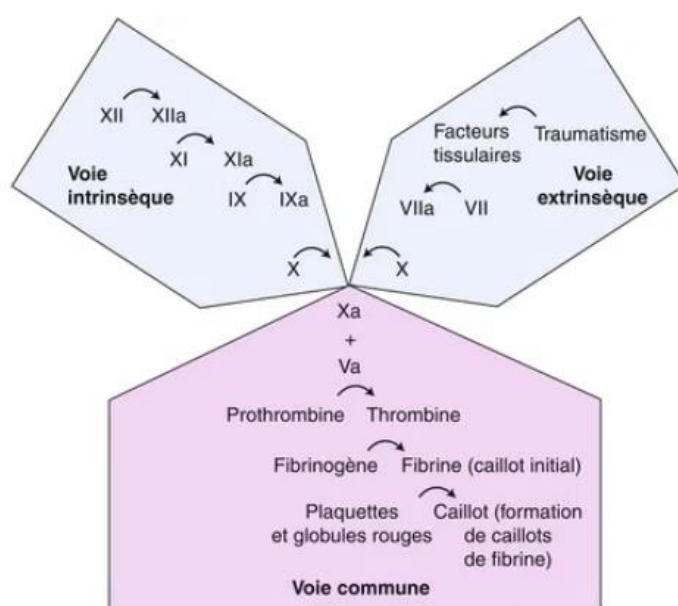


Figure 11 : Cascade de coagulation

Adaptée de Bonhomme and Fontana, 2015 (Bonhomme and Fontana, 2015)

Afin de prévenir la formation de caillots, de thrombus, une thérapie d'anticoagulation est mise en place et adaptée au patient et à la procédure. Dans la plupart des cas l'héparine non fractionnée (HNF) est utilisée. Son action est immédiate et sa demi-vie est de 2,5 heures pour 300-400 unités USP par kilogrammes (UI/kg). L'action de cette molécule est très bien connue, dosable et mesurable et surtout réversible. Les HNF peuvent se fixer à l'antithrombine III (AT-III), enzyme inhibitrice de l'activité pro coagulante du facteur Xa et IIa principalement et des facteurs VIIa, IXa, XIa et XIIa. La fixation des HNF sur l'AT-III va induire un changement de conformation de l'enzyme permettant d'augmenter son activité inhibitrice jusqu'à milles fois et donc permet de s'opposer à la coagulation efficacement. Les doses administrées varient selon les procédures effectuées et l'objectif visé.

Les objectifs peuvent-être fonction du temps de coagulation activé (ACT), temps que va mettre le sang pour coaguler après prélèvement ou par dosage des facteurs de coagulation comme le facteur Xa ou un objectif de concentration sanguine d'HNF (Isaacs et al., 2020). Lors de procédures courtes tels que les CEC mais très invasives et traumatisantes, par l'abord thoracique notamment, les canulations, débits imposés et longueurs du circuit de CEC les doses avoisinent les 250 à 400 UI/kg. Les objectifs d'anticoagulation devant être maintenus au décours des assistances circulatoires l'administration d'HNF peut-être en bolus répétée (pour les CEC) ou perfusion continue (ECMO ou assistances temporaires) prolongé. Un relai par des antivitamines K peut être envisagé pour les assistances de longue durée. Pour des CEC de longues durées, tels que les ECMO les doses initiales administrées sont moindres mais peuvent atteindre 50-100 UI/kg (Atkinson et al., 2016). En fin de procédure et afin de limiter les saignements pouvant survenir en post-opératoire, les HNF sont neutralisées par l'administration de sulfate de protamine principalement.

D'un autre côté, l'activation importante des plaquettes va induire une chute brutale de leur concentration et dans un contexte inflammatoire ou de dysfonction vasculaire peut aboutir à la formation de clou plaquettaire et de thrombus. Le suivi de la présence de D-dimères (activation fibrinolytique) et de facteur de von Willebrand (vWF, mesure de l'activation endothéliale) permet d'estimer dans certains cas le risque de thrombose. De plus chez certains patients peuvent être générées ou retrouvées des allergies ou des résistances à l'héparine qui complexifie la prise en charge (Cancian et al., 2020). Ainsi, il existe d'autres alternatives aux HNF pour l'anticoagulation sous CEC tels que les inhibiteurs directs des thrombines (Argaroban ou la Bivalirudin) qui ne seront pas discutées ici.

L'antagonisation des HNF par la protamine peut être aussi associée à une hypotension systémique et une hypertension artérielle pulmonaire après administration d'un bolus rapide. Bien que beaucoup plus rare, il est décrit également la possibilité de réaction anaphylactique médiée par l'injection de protamine mais aussi l'apparition d'œdème pulmonaire d'origine non cardiogénique. Enfin, il est possible de voir un phénomène d'*heparin rebound* apparaître par la redistribution d'héparine vers le compartiment central ou la distribution de protamine vers des compartiments périphériques (Peterson et al., 2018).

La fonction plaquettaire va donc ici jouer un rôle central et est souvent considérée comme étant l'un des éléments figuré du sang le plus impacté par une CEC : que ce soit par l'hémodilution ou par l'inflammation ou l'abrasion provoqué par les surfaces non biologiques (Squicciarro et al., 2021).

1.4.2.3.4 Fibrinolyse, kallikréine

La fibrinolyse se produit par l'action de la plasmine sur le caillot de fibrine pour former des produits de dégradation qui comprennent des D-dimères. La plasmine est générée pendant la CEC par l'action enzymatique précoce (dans les 30 premières minutes de CEC) du plasminogène, activée par le tPA. Ce dernier est produit par les cellules endothéliales en réponse à :

- Un composant activé de la cascade du complément, la kallikréine
- À la thrombine de la voie de coagulation, activée en parallèle
- L'action d'agonistes β -adrénergiques
- La bradykinine et les composants de l'activation plaquettaire

L'action du tPA peut être inhibé par la libération par l'endothélium, par exemple à la suite d'une inflammation importante, d'anti-plasmine et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), régulateur phare de l'hémostase. Trop peu de PAI-1 sont en faveur d'une forte fibrinolyse et donc de saignements. À l'inverse un excès résulte en une inhibition de la formation de plasmine et donc pro-coagulatrice. Lors d'une CEC, l'augmentation de la production et du relargage de PAI-1 est plutôt en faveur de thrombose postopératoire. Un déficit en PAI-1 va au contraire augmenter les risques hémorragiques.

1.4.2.3.5 Lésions ischémiques et de reperfusion

L'ischémie reperfusion est définie par une inadéquation entre les apports en oxygène et substrats métaboliques et les besoins tissulaires. L'ischémie et les lésions consécutives à la reperfusion sont souvent relatives à des limitation ou l'interruption de la perfusion des tissus et des apports en oxygène et en substrats énergétiques (Caccioppo et al., 2019). L'origine de l'ischémie peut survenir d'une mauvaise répartition du débit de perfusion à la suite d'une dysfonction cardiaque, vasculaire ou respiratoire par exemple. Cela peut être

également dû à une augmentation anormale de la résistance à l'écoulement sanguin voir une obstruction complète ou une rupture de lumières vasculaires (artériosclérose, accident vasculaire cérébraux, infarctus par exemple). L'objectif critique est alors de rétablir une perfusion adéquate, ou reperfusion, de l'organe impacté. Cependant cette reperfusion est également à l'origine de lésions cellulaires pouvant impacter la fonction tissulaire concernée.

Lors d'une ischémie, les voies classiques de production énergétique cellulaire, principalement de l'ATP et de phosphocréatine, deviennent insuffisantes par manque de substrat disponible. Pour maintenir une efficacité cellulaire permettant le maintien de ses fonctions, le métabolisme cellulaire devient un métabolisme glycolytique anaérobie, peu rentable sur le plan énergétique. Cette glycolyse anaérobie permet la conversion du pyruvate en lactate. Cela est à l'origine d'une augmentation intracellulaire en protons et donc une acidose. Cette dernière doit être compensée afin de retrouver un pH intracellulaire normal et donc entraîne l'activation de pompes ioniques tels que les échangeurs $\text{Na}^+\text{-H}^+$, afin de restaurer le pH (Allen and Xiao, 2000). L'afflux de Na^+ à son tour entraîne une augmentation de Sodium intracellulaire qui peut être compensée par l'activation d'autres pompes comme l'échangeur $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$, aboutissant une surcharge calcique potentiellement délétère pour la cellule. La prolongation de l'ischémie entraîne une accumulation de produits terminaux des différentes voies métaboliques (lactate, protons, ...), une augmentation de l'acidose, des troubles ioniques. Cela résulte en des lésions cellulaires irréversibles. Certains de ces produits accumulés sont retrouvés alors au niveau systémique et peuvent-être facilement mesurés en clinique, comme les lactates.

La réintroduction brutale d'oxygène dans des cellules dont le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale a été atteint par l'ischémie, et alors délétère pour la cellule : celle-ci ne peut alors pas utiliser correctement cet excès d'oxygène et de substrats. Cela aboutit en la production excessive d'espèces réactive de l'oxygène (ROS). Indirectement plusieurs mécanismes vont accentuer la production supplémentaire de ROS : La réactivation des pompes ioniques corrige très rapidement l'acidose au prix d'une surcharge calcique. Cette dernière est à l'origine de l'activation de nombreuses enzymes (protéases, lipases, NO synthases, ...) qui conduisent plus ou moins indirectement à une production accrue de ROS. Les produit de dégradation de l'ATP induit également à la reperfusion, une surproduction de ROS. Cet excès de ROS a des effets délétères pour le

fonctionnement cellulaire. Il conduit en particulier, par peroxydation lipidique, à des lésions des membranes cellulaires (dont la membrane mitochondriale), mais aussi à une activation indirecte de l'inflammation en recrutant les leucocytes et en stimulant la production de cytokines. Il existe de la même façon une augmentation de l'oxydation des protéines qui auront par accumulation un effet protéotoxique sur la cellule. Enfin, un certain nombre de cellules seront conduites vers la mort cellulaire par l'activation des voies de signalisation de l'apoptose (Cowled et al., 2001).

Lors d'une CEC les conditions d'hémolyse, de la dilution, les différences de délivrance du débit, la fonction vasculaire altérée et l'activation des neutrophiles jouent un rôle central dans le stress oxydatif et peuvent aboutir à une mauvaise répartition de la perfusion des organes (Zakkar et al., 2015). De plus lors d'une chirurgie cardiaque la reperfusion des tissus ischémiques à la suite du déclampage aortique, d'un CEC à débit non pulsatile et/ou de réanastomoses d'artères coronaires qui en résultent, fournit des plaquettes, des cellules sanguines inflammatoires et des enzymes impliquées dans les cascades inflammatoires et hémostatiques aux tissus ou à l'endothélium qui sont déjà dans un état amorcé ou pro-inflammatoire. L'activation ultérieure de l'inflammation, avec la libération consécutive de cytokines vasoactives, produit une vasodilatation microcirculatoire qui se manifeste par une hypotension et une hypoperfusion des organes terminaux. Il a été démontré que de courtes périodes d'ischémie, c'est-à-dire le pré-conditionnement (Murry et al., 1986), ont un effet protecteur contre des périodes ischémiques ultérieures plus longues dans divers organes, notamment le cœur, le foie, les poumons, les reins et le cerveau (Ali et al., 2007; Szabó et al., 2009). Une autre approche, le post conditionnement, consiste à appliquer les courtes séquences d'ischémies lors de la reperfusion et a montré avoir des effets bénéfiques également (Thibault et al., 2008). Ces mêmes effets peuvent-être approchés par une administration pré-opératoire de molécules comme l'insuline, le GLP-1, l'adénosine et l'EPO (Piot et al., 2008).

Pour autant le reconditionnement ischémique s'avère parfois insuffisant dans la prévention de la défaillance d'organe.

1.4.2.3.6 Activation endothéliale

Les conditions de perfusions et de débit lors d'une CEC et l'agression provoquée par des facteurs pro-inflammatoires, des endotoxines résultent en l'abrasion et parfois la déstructuration de l'endothélium vasculaire (Kumar et al., 2020; Selim et al., 2021). Cela peut aboutir en :

- Une dysfonction de la motilité vasculaire et de sa résistance à l'écoulement, responsable d'une augmentation de la perméabilité en faveur de l'extravasation de liquide et de cellules en extravasculaire (formation d'œdèmes, infiltration de cellules immunitaires) et d'une hypo réactivité vasculaire
- La sécrétion de facteur pro inflammatoire
- D'une dysfonction de la régulation par le monoxyde d'azote
- Une dysfonction de la coagulation

1.4.2.3.7 Translocation bactérienne, endotoxémie

Un des phénomènes bien décrit responsable du SRIS est également l'augmentation plasmatique d'endotoxines au décours d'une CEC (Kats et al., 2011). Ces endotoxines, principalement des lipopolysaccharides dérivés des parois de bactéries gram négatives, proviennent de la flore digestive. En conditions normales, ces éléments restent confinés dans la lumière du tractus digestif. Cependant, une hypoperfusion tissulaire digestive ainsi que l'inflammation pourraient être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité ou de la perte de la continuité du tapis endothélial qui régit les échanges entre les compartiments vasculaires et digestifs (Adamik et al., 2017). Cela induit une translocation de microorganisme ou d'endotoxines dans la circulation portale.

L'augmentation d'endotoxines circulante va avoir un effet potentialisateur des phénomènes inflammatoires et immunoréactifs déjà en place : activation de macrophages et production de cytokines, principalement le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 (Kelly et al., 1997).

1.4.3 Axes de recherches actuels et avancées récentes

La complexité et la multiplicité des mécanismes en réponse à une CEC favorise la survenue d'événements indésirables et donc d'une morbidité et mortalité associée aux procédures utilisées. Plusieurs stratégies de recherche ont été mises en place afin de trouver de nouvelles solutions dans le but de diminuer les conséquences dues à une CEC et de pouvoir limiter la survenue d'événements indésirables au décours de la CEC autant qu'après le sevrage.

Il est possible de distinguer plusieurs grandes approches visant l'amélioration de la prise en charge ou la détection de la survenue d'événement potentiellement délétère ou l'atténuation de la phase inflammatoire initiale et du SRIS par des innovations technologiques ainsi que pharmacologiques.

1.4.3.1 Adaptation de la procédure et du monitoring

Parmi les différents axes de recherche actuels qui visent à améliorer les conditions de circulation extracorporelles, l'un est particulièrement important et consiste à continuellement raffiner la procédure et le suivi du patient avant, au décours de celle-ci autant qu'à sa suite (Sarkar and Prabhu, 2017). Parmi ces axes majeurs de recherches, les plus souvent retrouvés sont ceux impliquant une optimisation de la prise en charge (monitoring, ventilation) du patient, les nouvelles stratégies pharmacologiques et les avancées technologiques proposées.

Parmi certaines stratégies étudiées, la gestion de l'hémodilution est un exemple bien documenté. La réduction de l'hémodilution permet l'amélioration à la fois de l'oxygénation et de la fonction rénale et limite l'inflammation. Pour envisager cela, plusieurs possibilités sont discutées :

- Le plus simple : est de limiter le volume mort du circuit de CEC, c'est le principe des mini-CEC qui sera développé plus tard
- Le rétro-priming : le circuit de CEC est rempli en partie par le sang du patient (Sun et al., 2013)
- L'ultrafiltration afin de récupérer et concentrer des éléments cellulaires

La conséquence attendue principal est la réduction des besoins transfusionnels lors de procédures chirurgicales.

Il existe de nombreuses stratégies et optimisations pour la prise en charge des patients, que ce soit de la gestion de la température à la gestion de l'hémodynamique et des grandes fonctions.

1.4.3.1.1 Miniaturisation des procédures

Nous avons vu précédemment que l'utilisation d'un circuit extracorporel impliquait la dilution du sang par le volume de *priming* du circuit. L'hémodilution doit être limitée et contrôlée. De plus, un circuit plus grand implique une plus grande surface de contact et donc une abrasion plus importante du tissu sanguin, avec une augmentation des conséquences. La réduction de la taille du circuit est donc une solution qui peut être intéressante pour limiter la survenue de complications : c'est le mini-CEC. Ce dernier permet de récupérer le sang par aspiration direct par une pompe et plus par gravité, de plus ce circuit fermé ne permet pas d'aspiration de cardiectomie à la différence d'un circuit « classique ». Il est donc observé une réduction significative du volume d'amorçage pouvant aller jusqu'au tiers de la normale (Anastasiadis et al., 2021). Bien que son utilisation ne soit pas cliniquement validée et éprouvée, il existe dans la littérature des preuves de la réduction des saignements postopératoires, du besoin de transfusions sanguines de micro-embolisation cérébrale et d'une amélioration de la fonction rénale postopératoire (Dimarakis, 2016) mais aussi de la morbi-mortalité (Anastasiadis et al., 2013). L'utilisation de ce circuit miniaturisé implique des changements importants dans la pratique chirurgicale et théoriquement est lié à d'autres risques (embolies gazeuses, difficulté à drainer les cavités cardiaques par exemple). Cette technique n'est donc pas éligible pour toutes les chirurgies cardiaques.

1.4.3.1.2 Pompes centrifuges et occlusives et pulsatilité

Les conditions de perfusions sont encore discutées à ce jour lors d'une CEC. La pompe à galet reste le dispositif le plus couramment utilisé (Hansbro et al., 1999). En plus des lésions associées à l'écrasement, la pression exercée sur les matériaux entraîne un risque de rupture de tubulure et un risque d'embolie consécutive. Les pompes à galets dites occlusives peuvent par exemple être remplacées par des pompes centrifuges qui évitent les phénomènes

d'écrasement du tissu sanguin. La pompe centrifuge confère par la force centrifuge son énergie cinétique au sang dans la tubulure. Ces pompes limitent les dommages causés aux globules rouges, aux plaquettes et aux protéines plasmatiques. Cependant, les pompes centrifuge sont plus limitées en débit maximum qu'une pompe occlusive, implique un volume mort de tubulure plus important, et donc un risque d'hémodilution du patient plus important (**Tableau 5**). L'utilisation de ce type de pompe est alors discutée pour son utilisation systématique.

Par ailleurs, la plupart des pompes délivrent un débit continu, là où le cœur physiologiquement délivre un débit pulsatile. La question a donc été de savoir si la restitution d'un débit pulsatile améliorerait les conditions de perfusions des organes et limiterait les altérations vasculaires. A ce jour la discussion visant l'amélioration de la perfusion ne permet pas de mettre en lumière une technique préférentiellement utiliser. L'étude des répercussions, de l'optimisation du débit (L/min), du matériel (pompe centrifuge ou pompe occlusive) est particulièrement complexe.

Sur des patients recevant une ECMO de longue durée, l'utilisation d'un débit continu associer à l'ensemble des éléments présentés précédemment montrent plusieurs problèmes allant de l'œdème à la défaillance de plusieurs organes. D'un autre côté les assistances ventriculaires pouvant développer un débit pulsatile, même si altéré, sont très bien supportées et sont à l'origine de conséquences globale limitées.

L'efficacité du débit pulsatile a été étudiée et ses bénéfices documentés (Borulu et al., 2020). La pression pulsatile permettrait une amélioration de perfusion de la microcirculation, une diminution de la résistance périphérique. D'autres auteurs montrent qu'une pression continue induit un collapsus capillaire, à une réduction du débit de perfusion dans certains territoires. Quelques auteurs avancent que ce serait la pulsatilité induirait une diminution de production de •NO dans les vaisseaux de faible calibre à l'origine d'une constriction. Parsons suggère très tôt que l'impact de la pulsatilité induirait une diminution de la formation d'œdème dans un modèle simplifié chez le lapin (Parsons and McMaster, 1938). Pour autant plusieurs études montrent que la pulsatilité n'aurait pas un intérêt majeur dans son utilisation clinique quotidienne (Maguire et al., 2020). L'utilisation de flux pulsatile durant une CEC

et son adaptation font toujours l'objet de débat et l'apport de nouvelles données cliniques et expérimentales doivent être apportées.

Tableau 5 : Comparaison des caractéristiques des pompes occlusives et centrifuges

Pompes occlusives	Pompes centrifuges
Indépendant de la post charge	Indépendant de la post charge
Augmente l'abrasion du tissu sanguin et de la tubulure	Diminue l'abrasion du tissu sanguin et de la tubulure
Pas de risque de retour de sang	Risque de retour sanguin si arrêt
Peu couteux	Couteux
Usage sur le court terme	Portable, usage sur le long terme
Peut conduire à des ruptures de tubulure et/ou embolies gazeuses	Priming plus important du circuit Pas de risque de rupture de tubulure

1.4.3.1.3 Filtration du sang

La possibilité de filtrer, voire d'épurer, le sang par un système associé au circuit de CEC est intéressant. Certains de ces systèmes sont utilisés et éprouvés cliniquement :

La récupération des globules rouges per CEC permet de remplacer l'aspiration de cardiectomie et sépare les globules rouges du plasma et des débris par lavage et centrifugation différentielle, fournissant une concentration élevée de globules rouges et peu ou pas de contaminants. Le sang peut être stocké dans de la solution saline héparinée puis les globules rouges sont retenus alors que sont éliminés par lavage : le plasma, les plaquettes, l'héparine, l'hémoglobine libre et les médiateurs inflammatoires. Les globules rouges obtenus sont resuspendus, concentrés et réinjectés. Cette procédure, bien que générant moins d'inflammation que l'aspiration de cardiectomie n'est pas exempte de problème pour autant :

le contact air-fluide est toujours présent et une déplétion en plaquettes et facteur de coagulation est observé.

L'utilisation d'hémofiltres ont été mis au point afin de limiter l'hémodilution en permettant d'augmenter l'hématocrite et en améliorant l'hémostase (Soliman et al., 2016). Il s'agit de dispositifs d'ultrafiltration composés de fibres microporeuses qui permettent d'éliminer les solutés du plasma sans perte de protéines et de facteurs de coagulation. Récemment, quelques études mettent en évidence une élimination de facteurs du complément et de cytokine pro inflammatoires per CEC. L'ajout de surfaces de contacts pour le tissu sanguin induisent une activation du complément, l'augmentation du traumatisme des globules rouges et l'augmentation de l'hémoglobine libre plasmatique, témoin d'une hémolyse. Plus récemment quelques études associe une hémofiltration per opératoire à la survenue d'insuffisance rénale en post-opératoire (Matata et al., 2015; Zanaboni et al., 2021).

Actuellement de nouvelles solutions de filtrations ou d'adsorption de composées sont évalués lors d'une CEC. Parmi ces approches nous pouvons citer des technologies comme oXiris®, CytoSorb® ou Toraymyxin® qui utilisent une membrane permettant l'adsorption de molécules tels que cytokines pour diminuer le SRIS (Malard et al., 2018). Ce principe est envisagé pour sélectivement épurer le sang circulant de cytokines, facteurs du compléments, hémoglobine libre, capter des molécules pharmacologiques ou médiateurs endogènes (catécholamines par exemple). Dans le même but il a récemment été mis au point des systèmes d'adsorptions comme le CytoSorb qui permettrait d'éliminer non sélectivement des cytokines et petits médiateurs circulant (Diab et al., 2020; Rieder et al., 2021). Si les composés de faible tailles impliqués dans le SRIS sont majoritairement visés par ces approches, certaines populations cellulaires peuvent également être retenues ou au contraire évacués. Parmi ces populations, les leucocytes, en particulier les neutrophiles, sont des cibles intéressantes : leurs activations étant déterminants dans la genèse du SRIS. De nouvelles stratégies de filtration visent à réduire la concentration en leucocyte pour diminuer l'effet de leur activation. Un grand nombre de ces approches sont testées au niveau expérimental ou en clinique actuellement, démontrant plus ou moins d'effets potentiellement bénéfique. Pour autant plusieurs problèmes sont liés à leur utilisation : augmentation du contact sang/matériaux, augmentation du risque d'hémolyse mais aussi manque de contrôle de la

nature et de l'importance des éléments épurés, en particulier pour les adsorptions non sélectives comme pour le CytoSorb.

1.4.3.2 Principe de base du monitoring

Le monitoring des patients sous CEC comprend des éléments immuables mais également des éléments qui doivent-être adaptés au patient. Tout d'abord le suivi des fonctions hémodynamique ventilatoire et de l'hémostase est primordial sur l'ensemble de la procédure. Ensuite, il y a un monitoring spécifique de la CEC. Enfin peuvent s'ajouter à cela de nouveaux monitoring de fonctions bien précises. Pour résumer nous pouvons émettre la liste, non exhaustive, suivante des monitorages principalement retrouvés ainsi que leurs objectifs :

- Monitoring hémodynamique : cathétérisme artériel et veineux (saturation du sang veineux) : pression de perfusion, pressions artérielles, débit cardiaque, fréquence cardiaque, pression pulmonaire d'occlusion, facteur de performance cardiaque. Le but est de s'assurer de la faisabilité, du résultat de la CEC et des fonctions post-opératoires hémodynamique
- Monitorages ventilatoires pour adapter et contrôler la ventilation (pression en fin d'expiration, contrôle de pression et ou de volume. Fraction inspirée, expirée des différents gaz
- L'évaluation du débit de la pompe et de la saturation en oxygène sur la ligne veineuse (SvO₂-CEC)
- Le monitoring des lactates, gaz du sang, glycémie, électrolytes, hémoglobinémie en amont et/ou en aval de l'oxygénateur servent à vérifier l'efficacité de l'oxygénation
- Pressions transmembranaires de l'oxygénateur afin de déceler un dysfonctionnement de l'oxygénateur.
- Mesure du temps de coagulation ou de paramètres d'évaluation de la coagulation adapté à la stratégie mise en place pour l'anticoagulation

Chez certains patients :

- Mise en place d'un cathéter de Swan-Ganz : permet la mesure de la SvO₂, de la pression artérielle pulmonaire, et de la pression capillaire pulmonaire. Son utilisation systématique est discutée
- L'échocardiographie transœsophagienne qui permet de repérer également des dispositifs intracavitaires (canules...) et d'évaluer la pré-charge et la volémie efficace, la mesure du débit cardiaque, les fonctions diastolique et systolique VD et VG, et qui permet la mise en évidence d'un défaut de réparation chirurgicale ou d'un obstacle à l'éjection VG. Son utilisation est validée et approuvée mais pas nécessairement systématique.
- L'électroencéphalogramme (indice bi spectrale ou BIS) et le monitoring de la curarisation avec pour objectif d'assurer l'analgésie, le confort du patient

A cela peut s'ajouter plusieurs éléments de monitoring qui sont fréquemment discutés dans la littérature comme l'utilisation de la spectrométrie en proche infrarouge (SPIR ou NIRS) cérébrale ou somatique. La NIRS permet le monitoring de la microcirculation périphérique, plus particulièrement par la mesure non invasive de l'oxygénation tissulaire régionale. Plus généralement utilisée en regard de l'encéphale, elle permettrait de détecter précocement une ischémie cérébrale. Au niveau somatique elle peut être utilisée afin de détecter une ischémie des membres inférieurs, en particulier sur les ECMO : en aval du site de canulations artérielles.

Chez le très jeune enfant la NIRS peut être utilisé plus simplement au niveau somatique, ce qui est difficilement concevable chez l'adulte : en effet cette technique souffre de nombreux désavantages, comprenant une difficulté à être reproductible mais surtout une profondeur de mesure limitée. L'intérêt de la systématisation de l'utilisation de la NIRS au niveau cérébrale autant qu'au niveau somatique nécessite l'apport de nouvelles preuves plus solides à ce jour (Scolletta et al., 2019).

1.4.4 Optimisation des matériaux

L'un des axes de recherche les plus important actuellement est l'optimisation des matériaux utilisés, en particulier pour améliorer le contact entre le sang et ces derniers. Un des pans les plus décrit dans littérature est l'amélioration de la gestion de la coagulation et de la surface de contact entre sang et matériaux. Optimisation du circuit et de la tubulure

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour prévenir la thrombose induite par les dispositifs médicaux. Les anticoagulants tels que l'héparine sont couramment administrés pendant les procédures. Cependant, les anticoagulants augmentent le risque d'hémorragie, en particulier chez les patients qui présentent déjà des lésions hémorragiques graves.

Les circuit pré-héparinés ou revêtu d'albumine constituent une autre approche. Le revêtement du circuit avec de l'héparine permettrait la réduction de l'activation de contact, la rendant plus compatible avec le tissu sanguin. Le principal avantage de cette stratégie est d'offrir la possibilité de diminuer les niveaux d'anticoagulation systémique pour avoir un effet similaire. Cela peut conduire à une réduction des saignements postopératoires et des transfusions sanguines, particulièrement pour les CEC de longue durée. La principale limitation des surfaces héparinisées est que leurs effets inhibiteurs peuvent ne pas être suffisants pour compenser l'activation coagulatrice qui résulte de l'abrasion constante du tissu sanguin. De plus il reste à déterminer la faisabilité de son utilisation sur de longues CEC.

Les revêtements polymères permettant la libération de $\bullet\text{NO}$, qui ont également montré une capacité prometteuse à inhiber l'activation et l'agrégation plaquettaires et pourraient être une bonne alternative aux revêtements actuels. Cependant, peu d'études ont pu être réalisées à l'aide d'un circuit de CEC complet (tubulure, membrane, cathéter et pompe à sang), dans des conditions qui simulent les conditions de la vie quotidienne ou en clinique.

Récemment une alternative s'inspirant des parois vasculaires a été présentée dans la littérature. Physiologiquement les membranes sont composées de phospholipides négativement et positivement. Les lipides, antithrombotiques, neutres, zwitterioniques tel que la phosphorylcholine prédominent dans la membrane externe alors que les chargés négativement sont plutôt orientés à la face interne de la membrane. Cette asymétrie joue un

rôle l'équilibre entre hémostasie et thrombose. Un revêtement composé de phosphorylcholine ou le polycarboxybetaine du circuit CEC vise à imiter la membrane cellulaire naturelle, et à réduire ainsi l'interaction entre les protéines plasmatiques et la surface interne du circuit (Naito et al., 2021; Roberts et al., 2021, 2020). Le seul avantage démontré à ce jour est une réduction de l'activation plaquettaire et des pertes sanguines postopératoires

1.4.4.1 Optimisation des oxygénateurs

Les oxygénateurs assurent l'hématose par le rapprochement des hématies de la membrane, pour cela un flot turbulent permet d'amener continuellement les globules rouges sur la surface d'échange gazeux. Le débit et la composition du mélange oxygène/air imposé à l'oxygénateur permet de régler la P_aO_2 . Le débit de gaz frais impose la P_aCO_2 . Cela implique l'augmentation significative de la résistance à l'écoulement du sang.

Un des majeurs inconvénients des membranes d'oxygénation est leurs capacités à abraser le tissu sanguin. De plus, la structure même de l'oxygénateur induit une adsorption au cours du temps de protéines, fibrines, de caillots, plaquettes qui vont réduire de plus en plus l'efficacité de l'oxygénateur.

Des membranes d'oxygénateurs pré-héparinés ont été développées pour reproduire les propriétés du revêtement endothélial naturel du système vasculaire. Des études ont montré une meilleure biocompatibilité globale, avec une adhésion réduite des protéines plasmatiques et la prévention de la dénaturation et de l'activation cellulaire de la même façon qu'avec les circuits usant la même approche. Il est assez intéressant de noter une diminution de la thrombocytopénie induite par la CEC.

Broun & Canh en 1977 proposent également de coupler les membranes d'oxygénations à des enzymes pour compléter l'activité d'hématose ou la faciliter (Broun and Canh, 1977). Par exemple des projets récents ont conduit au dépôt de demande de brevet afin de protéger l'utilisation de nouveaux oxygénateurs couplées à de l'anhydrase carbonique ce qui faciliterait la décarboxylation (Arazawa et al., 2012; Salley et al., 1990). Cette application pourrait-être importante chez des patients hypercapniques.

1.4.5 Les nouvelles approches pharmacologiques

Toutes les avancées et recherche technologiques ne peuvent que limiter la survenue des conséquences d'une CEC, d'autant plus si celle-ci est prolongée. Les outils pharmacologiques permettent de renforcer ces effets. Actuellement, peu de nouvelles molécules sont développées pour diminuer le SRIS dans cette indication. En revanche, de nombreuses molécules ou ajustement de protocoles sont actuellement testées. Ces avancées concernent majoritairement le traitement symptomatique des complications de la CEC. Les différentes classes de molécules les plus étudiées ces 10 dernières années sont : les anti fibrinolytiques et anticoagulants, les anti oxydants et inflammatoire, vasopresseurs ou inotropes et les anesthésique/opioïdes/curare. Voici quelques exemples des molécules les plus cités.

L'aprotinine est un inhibiteur aspécifique de la fibrinolyse et d'enzymes protéolytiques importantes tel que la kallikréine et la plasmine. Son indication principale était de réduire le saignement au niveau des abords chirurgicaux thoraciques, de la même façon que l'acide tranexamique. Si des études pointent un potentiel rôle dans la diminution du SRIS à de faibles doses d'aprotinine ces dernières sont démenties par la suite. Toutefois la sécurité de ce médicament a été remise en question en 2006 par une balance bénéfice risque non favorable : la morbi-mortalité serait trop haute. L'essai canadien BART (Blood Conservation using Antifibrinolytics : a Randomized Trial in high-risk cardiac surgery patients) conclu en 2007 que l'aprotinine, comparé notamment à l'acide tranexamique, était le plus efficace pour réduire risque de saignement post-opératoire. Néanmoins cet essai est interrompu peu après en confirmant un surrisque de mortalité important (Van Aelbrouck et al., 2012). Plus récemment l'utilisation de l'aprotinine n'a pas prouvé d'effet sur le SRIS chez les patients adultes. La haute autorité de santé (HAS) publie ces mêmes conclusions lors d'une réévaluation en 2017.

Concernant la coagulation, les alternatives pharmacologiques à l'héparine sont étudiées. Parmi les approches innovantes, l'utilisation d'aptamères, séquences oligonucléotidique synthétique, le plus souvent ARN, a été et est encore testé. Par exemple la pegnivacogine, ciblant le facteur FIXa et réversible par le Anivamersen a fait l'objet d'études précliniques et cliniques REGULATE-PCI (Lincoff et al., 2016). Cette étude

internationale, multicentrique, randomisée, ouverte, contrôlée, menée par Lincoff sur plus de 3 200 patients, n'a pas montré d'effet supérieur à la molécule contrôle. REGULATE-PCI est arrêtée précocement après avoir mis en évidence des réactions anaphylactique dans 1 % de traités, dont un cas mortel. Cet essai d'anticoagulant contrôlé a permis de montrer la faisabilité de l'approche. Ainsi un aptamère « 11F7t » inhibant l'activité du facteur X (FX) combiné à un inhibiteur du site catalytique du FXa ou un aptamère de la thrombine est envisagé. L'inverse est aussi envisageable par le développement d'aptamères pro-coagulants pour d'autres indications (Bompiani et al., 2014). Le ciblage spécifique de composés circulant peut-être également médié par l'utilisation d'anticorps, cependant il n'y a pas de réversibilité possible. Il existe des tests d'anticorps spécifiques dirigés par exemple contre certains éléments du système du complément également.

Actuellement la gestion des radicaux libres issus de lésions d'ischémie et reperfusion est étudiés afin de limiter les dommages tissulaire et l'augmentation de l'inflammation. Les principales stratégies consistent en l'utilisation de *scavengers* qui auront pour fonctions de piéger les ROS. Parmi ces molécules « antioxydantes » il peut être compté les vitamines (E et C) ainsi que le mannitol, l'allopurinol et la N-acétyl cystéine. Pour autant les réels bénéfices lors d'études cliniques sont controversés (McDonald et al., 2014). Pour conclure les recherches de nouvelles approches pharmacologiques dans le cadre de la CEC réutilise beaucoup de concepts et de molécules déjà en place ou retrouvé dans l'indication d'autres pathologies. Le développement de nouvelles approches nécessite la possibilité de les tester sur des modèles représentatifs de la physiopathologie.

1.4.6 Modèles de Suppléance cardio-pulmonaire

Le développement de nouvelles pistes thérapeutiques et la validation des différentes hypothèses passent par le développement de modèle d'étude. Il existe différents modèles permettant une étape préclinique de tests de composés, matériaux ou procédures. Ces différents modèles peuvent-être *ex vivo* ou *in vivo*.

1.4.6.1 Modèle *ex vivo*

Les modèles *ex vivo* permettent d'exposer les circuits de CEC à du sang ou à des éléments circulants spécifiques. Ces montages sont particulièrement utilisés pour démontrer l'intérêts de nouveaux matériaux biocompatibles, couplés à un nouveau revêtements tel que les polymères zwiterioniques, ceux couplés ou non à des donneurs de •NO ou les nouveaux oxygénateurs (Malfertheiner et al., 2020; Roberts et al., 2020).

Une revue de littérature récente de Malfertheiner et collaborateurs propose une description détaillée des usages possible de ce type de modèle. Brièvement ils mettent en évidence que ces modèles *ex vivo* ont servis à évaluer notamment :

- La performance d'oxygénateurs au niveau des échanges gazeux ou de la perte de fluide
- La performance de pompes
- Les fonctions hémostatiques et de coagulations
- L'analyse de pharmacocinétique

Pour autant, ils soulèvent des limites importantes dans l'utilisation de ces modèles. Par exemple, les fluides ayant les mêmes caractéristiques rhéologiques que le sang ne sont pas toujours utilisables ou disponibles ce qui est source de biais. Le volume sanguin chargé dans le circuit et l'hémolyse en cours dans les modèles *ex vivo* limitent également le temps pendant lequel les tests peuvent être effectués.

Si l'utilisation de ces modèles est nécessaire dans un premier temps, le passage chez l'Homme nécessite l'utilisation de modèles plus intégrés.

1.4.6.2 Modèle chez le gros animal

Le modèle le plus proche de ce qui est utilisé en clinique reste le modèle animal, principalement chez le porc. C'est le modèle le plus pertinent actuellement grâce à sa proximité anatomique et son volume sanguin comparable. Malgré des différences de position anatomique due à la différence de station entre l'Homme (debout) et le porc (4 pattes), les procédures effectuées chez l'Homme sont transposables au porc. Si cela est un atout considérable, cela rend également ce modèle extrêmement coûteux. Son utilisation est donc réservée à des stades avancés des tests précliniques ou pour l'entraînement des équipes chirurgicales. De manière intéressante, il existe également d'autres modèles de gros animaux permettant les tests de certains composés au niveau préclinique généralement les espèces utilisées sont par exemple les chiens ou les chèvres.

Par ailleurs, malgré les fortes similitudes entre l'Homme et le gros animal la différence d'espèce peut toutefois engendrer une différence de réponse à certaines approches pharmacologiques ou des différences dans la régulation de l'hémostase, de la coagulation ou encore des réponses inflammatoires.

Les utilisations de ces modèles sur gros animaux sont donc favorisées pour les études ne pouvant pas être faite dans un premier temps chez le petit animal telles que les études de greffe pulmonaire, cardiaque ou la chirurgie des gros vaisseaux thoraciques ou encore les études pré-cliniques de matériaux validés au préalable *ex vivo* ou sur un autre modèle *vivo*.

1.4.6.3 Modèle chez le petit animal

Les modèles décrit chez le petit animal sont principalement réalisés sur des lagomorphes ou des modèles murins, principalement les rats et plus rarement les souris. Il est important de préciser qu'il existe une certaine proximité entre les différents modèles de petits animaux et l'Homme, notamment au niveau des grandes fonctions régulées telles que la fonction rénale, cérébrale, cardiaque, inflammatoire, hémostatique, vasculaire et hépatique (Fujii et al., 2016; Malfertheiner et al., 2020; Selim et al., 2021). Il réside également quelques différences notamment chez les animaux de petite taille comme les rongeurs où la fréquence cardiaque est plus élevée : environ 500 à 600 battements par minute chez la souris et 250 à 450 bpm chez le rat. La surface corporelle impactée par la chirurgie

chez ces animaux induit une perte rapide de chaleur corporelle. La gestion de la température peut donc s'avérer compliquée mais reste un point essentiel.

La difficulté de la mise en place d'une circulation extracorporelle chez le rongeur ou chez le lagomorphe réside dans la miniaturisation de tous les éléments qui devront être utilisés. Il est important de noter également que les abords vasculaires utilisés pour la CEC sont périphériques : les veines jugulaires, les veines caudales dorsales ou ventrales, fémorales ainsi que les artères carotidiennes et fémorales. Cela sous-entend également que la circulation extracorporelle créée chez le petit animal se rapproche plus de l'ECMO que d'une CEC utilisée en chirurgie cardiaque.

Enfin il est nécessaire de prévoir et d'affiner chacune des procédures chirurgicales si le réveil des animaux est souhaité. En effet, cela est facilement explicable par la difficulté de réanimer, transfuser ou de réopérer un rongeur sans impacter la reproductibilité et la fiabilité des données exploitables.

Le circuit, les injectables et le monitoring doivent être en particulier adaptés à la taille de l'animal (Fujii et al., 2016). Il est assez intuitif sur des animaux pouvant aller de 20 grammes à un kilo avec une faible surface corporelle que l'application de monitoring de surface ou que l'accès aux différents abords vasculaires soient limités. Les abords thoraciques, par exemple, par sternotomie sont difficilement envisageables si l'on souhaite réveiller l'animal et reste compliqué sur une étude n'impliquant pas le suivi post-opératoire (Günzinger et al., 2007; Peterss et al., 2014). Cela limite les études possibles chez cet animal. Pour autant, ces modèles restent beaucoup moins coûteux. La miniaturisation de la circulation extracorporelle passe par la réduction et l'adaptation du circuit de circulation au volume de l'animal. Ce point est crucial pour limiter l'hémodilution consécutives à la procédure. De la même manière, tout le matériel de soins ou chirurgical doit être adapté à la taille de l'animal. Par exemple, il peut être difficile de trouver des sondes d'intubation orotrachéal adaptée à une intubation et ventilation invasive de longue durée, ou encore de trouver des cathéters adaptés, notamment la canule veineuse qui servira à récupérer le sang par aspiration ou gravité. En effet, celles utilisées chez le gros animal ou chez l'Homme sont des canules plastiques ou métallique multi perforé qui permettent la récupération du sang de façon optimisée. La modification de canules préexistante afin d'obtenir le même résultat chez

le petit animal implique de fragiliser le matériel mais également de le rendre plus traumatique pour les vaisseaux et le sang. De plus, la plupart des modèles décrits chez le rongeur utilise des abords fémoro fémoral et caudaux qui éloigne le modèle d'un by-pass cardio-pulmonaire là où il serait préférable d'utiliser des abords plus centraux comme la jugulaire et la carotide. Ces deux abords permettent d'accéder simplement aux veines cave inférieur et supérieur ainsi qu'à la crosse de l'aorte ce qui permet une perfusion dans le sens physiologique du flux sanguin. Dans le contexte d'un bypass cardio-pulmonaire, la canulations de la carotide devrait alors être privilégiée.

L'utilisation d'anesthésiants, d'hypnotiques, de morphiniques et curares sont facilement possible avec les rongeurs. Parmi ces classes thérapeutiques, les plus intéressantes dans les modèles de CEC sont les gaz halogénés comme l'isoflurane ou le sévoflurane, le propofol, le fentanyl le sufentanil ou le rémifentanil et des curares. De la même manière, l'anticoagulation peut se faire de la même façon qu'en clinique avec l'administration d'héparine non fractionnée qui pourra être antagoniser par de la protamine si besoin. Toutefois les doses doivent-être finement adaptée chez les rongeurs afin d'éviter les surdosages. Ces modèles permettent également l'utilisation de divers monitoring notamment hémodynamique, de gaz du sang, électrolytique, métabolique, ventilatoire et parfois de la mesure de l'oxygénation tissulaire régionale par différentes méthodes.

Ces modèles ont permis au cours des 20 dernières années d'évaluer certaines molécules à but thérapeutique ou de nouveaux matériaux pour le circuit de CEC. Néanmoins, dans la très grande majorité de ces études, les animaux ne sont pas réveillés ce qui limite l'interprétation à long terme de ces résultats.

Il est donc nécessaire et urgent de développer un modèle de CEC chez le petit animal qui soit le plus proche de ce qui est réalisé en clinique mais dont la procédure permet le réveil pour évaluer de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des conséquences multi-organes de la CEC suite au développement d'un SRIS.

1.5 La voie de réponse intégrée au stress

La perturbation de l'homéostasie nécessite la mise en œuvre de processus de régulation du maintien des différentes constantes physiologiques afin de rétablir un fonctionnement optimal et/ou de prévenir l'apparition de troubles. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la réponse spécifique aux agressions cellulaires pour prévenir des dysfonctions cellulaires délétères pour le ou les tissus impactés. L'une de ces voies est la voie de réponse intégrée au stress, appelée également ISR. Cette voie de signalisation ubiquitaire est initiée par de nombreuses sources de stress et est finement régulée dans les cellules eucaryotes pour prévenir la mort cellulaire.

1.5.1 La voie de l'ISR et sa régulation

La voie de l'ISR est activée à la suite d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire dans un contexte physiologique ou pathologiques. Ces stress peuvent être de diverses origines :

- Extrinsèque, par un apport insuffisant en oxygène, ou hypoxie, la privation en acide aminé, en glucose, en réponse à une infection virale ou à certains oncogènes ou des composés
- Intrinsèque, avec le stress du réticulum endoplasmique (RE) ou stress protéotoxique. Le stress du RE consiste en un défaut de protéostasie et plus particulièrement à l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, provoquant un stress cellulaire important

La survenue de l'un de ces stress aboutit au recrutement et à l'activation d'une des cinq enzymes spécifiques qui ont toutes pour cible la phosphorylation sur la sérine 51 de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2 α) (p(ser51) - eIF2 α). Il s'agit de l'évènement catalysant l'activation de l'ISR. Cette phosphorylation de eIF2 α a pour conséquence une réduction de la synthèse globale des protéines Cap-dépendantes tout en favorisant la traduction Cap indépendantes de gènes préférentiellement sélectionnés pour résoudre le stress. Parmi ces derniers, le facteur de transcription activateur 4 (ATF4) joue un rôle prépondérant dans la survie et la récupération cellulaire. En tant que facteur de transcription, il régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acide

aminée, dans l'autophagie, ou encore dans la réponse au stress oxydatif mais également dans la régulation de la phosphorylation de eIF2 α . En effet, ATF4 permet la transcription d'une sous unité régulatrice de la phosphatase PP1c, PPP1R15A. Exprimé en condition de stress, PPP1R15A se lie à la sous unité catalytique, PP1c, pour former le complexe phosphatase responsable de la déphosphorylation de eIF2 α permettant alors la reprise de la synthèse protéique (**Figure 12**). Lors d'un stress peu sévère ou de faible intensité, l'activation de la voie de l'ISR par la phosphorylation de eIF2 α et la réduction transitoire de la synthèse protéique seront suffisantes pour résoudre le stress et ses conséquences sur l'homéostasie cellulaire. En revanche, lors d'un stress cellulaire sévère, soit en intensité ou soit en durée, l'activation de l'ISR et l'atténuation transitoire de la synthèse protéique ne seront pas suffisamment longue pour résoudre le stress, ce qui a pour conséquence l'activation de l'apoptose.

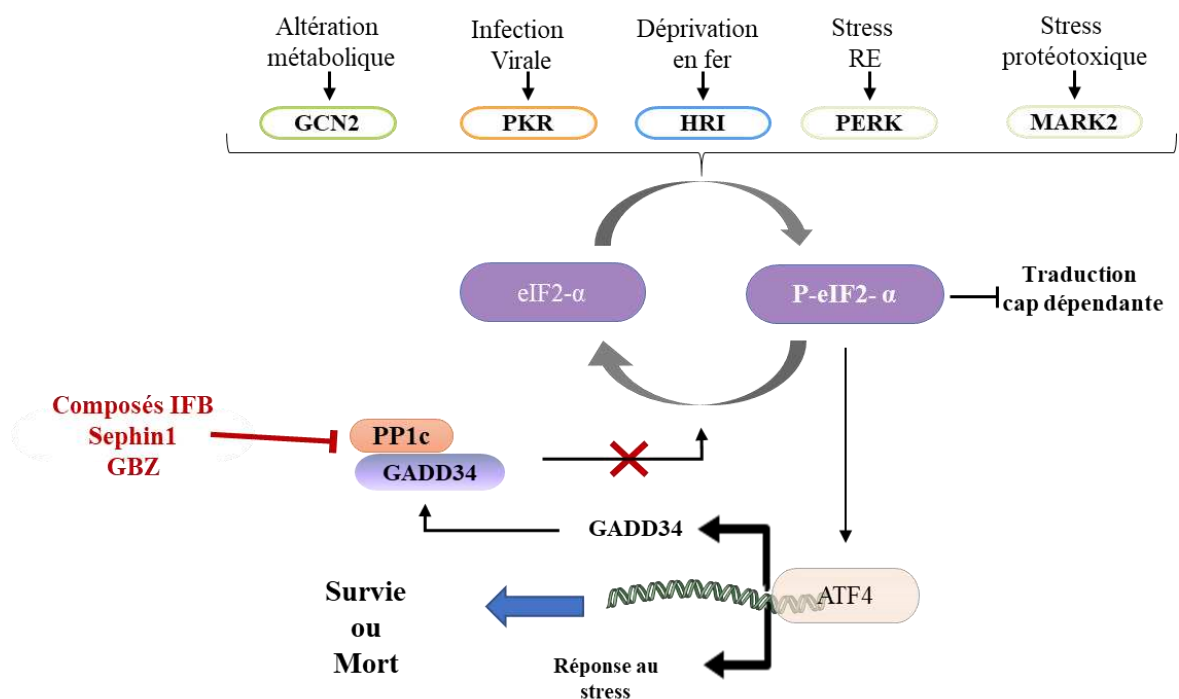


Figure 12 : Voie de réponse intégrée au stress et modulation par des molécules chimiques

GCN2 : *general control nonderepressible 2* ; PKR : *Protein kinase-R* ; HRI : *Heme regulated inhibitors* ; PERK : *PKR-like ER protein kinase* ; MARK2 : *microtubule affinity-regulating kinase 2* ; eIF2- α : *Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2* ; ATF4 : *Activated transcription factor* ; PP1c : *Protein phosphatase 1 c*

1.5.1.1 Enzymes initiateuses de la réponse au stress

L'activation de la voie de l'ISR et donc de la phosphorylation de eIF2 α dépend de la détection de l'un ou de plusieurs stress extrinsèques ou intrinsèques par au moins une des enzymes décrites ci-après.

1.5.1.1.1 PKR

L'activation de *Protein kinase-R* (PKR) est majoritairement initiée par les interférons et les ARN doubles brins (ARNdb) et donc le plus souvent au cours d'une infection virale. Cependant, son activation peut être consécutive à des événements indépendants de l'ARNdb comme par les infections bactériennes, le stress de l'ER, les caspases ou l'héparine. L'activation de PKR est permise par une dimérisation du domaine kinase en C-terminal entraînant l'autophosphorylation du résidu thréonine en position 446.

1.5.1.1.2 HRI

L'*Heme regulated inhibitors* (HRI ou EIF2AK1) est principalement exprimée dans les cellules impliquées dans l'érythropoïèse. HRI est surtout connu pour son rôle dans le couplage entre la disponibilité de l'hème et la synthèse de la globine dans les cellules érythroïdes précoces (Burwick and Aktas, 2017). Comme pour les autres eIF2 α kinases, l'activation de HRI nécessite une dimérisation et une autophosphorylation de son domaine kinase. La régulation de l'activité kinase de HRI par l'hème est médiée par les deux domaines de liaison à l'hème qui sont situés dans l'extrémité N-terminale et le domaine d'insertion de la kinase. L'hème inhibe l'activité de HRI en favorisant la formation de ponts disulfures entre les monomères de HRI. La forme dimérique est alors inactive. En absence d'hème, un dimère de HRI se forme par des interactions non covalentes permettant l'activation de l'activité de kinase de HRI. En plus de sa sensibilité à l'hème, HRI est également activée par le stress oxydatif induisant l'activation de chaperonnes comme Hsp90. Le rôle précis de l'HRI, distinct de celui des autres kinases eIF2, dans les tissus au-delà de la lignée érythroïde reste encore à être déterminé.

1.5.1.1.3 PERK

La protéine, intracellulaire *PKR-like ER kinase* (PERK ou EIF2AK3) est ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique, organelle cellulaire impliquée dans la conformation, le *trafficking* et les modifications post-traductionnelles des protéines (Y. Wang et al., n.d.). Cette kinase est une des médiateurs majoritaires du stress du RE. Cette protéine comporte deux domaines principaux : un domaine cytoplasmique qui est lié en absence de stress à une chaperone du RE, la *Binding immunoglobulin protein* (BiP, HSP70 ou GRP78) et un domaine kinase. Suite à un stress du RE, PERK est activée. Deux modèles d'activation de PERK par le stress du RE ont été proposés. Dans le premier modèle d'activation, l'accumulation de protéines mal conformées au sein du RE entraîne la dissociation de PERK de la chaperonne GRP78, cette dernière se liant préférentiellement aux protéines mal conformées. Cette dissociation entraîne l'autophosphorylation de PERK et son activation. Le second mécanisme décrit une activation directe de PERK par la liaison de protéines mal ou non repliées à son domaine luminal. Comme pour les autres kinases, PERK pourrait être activée par d'autres mécanismes par exemple dans les cellules β -pancréatique en réponse à la privation en glucose (Moore et al., 2011). Cette privation serait à l'origine d'une déplétion en ATP entraînant l'inhibition de la pompe Ca^{2+} -ATPase sarcoplasmique/ER permettant l'activation de PERK (Moore et al., 2011).

1.5.1.1.4 GCN2

La kinase *GC nonderepressing 2* (GCN2) est le principal censeur de la privation en acide aminé et la seule kinase de eIF2- α qui soit conservée dans la quasi-totalité des organismes eucaryotes (Xia et al., 2018, p. 2). La privation en acide aminé implique par conséquent un défaut de traduction des ARNm en protéines. En effet les ARNt non chargés en acides aminés s'accumulent dans le cytoplasme, ils se lient alors à GCN2 sur une région homologue aux histidyl-ARNt synthétases. Cette liaison non chargée conduit au changement de conformation de GCN2 induisant son autophosphorylation et son activation. Cette activation implique principalement la privation en histidine mais aussi des autres acides aminés qu'il soit essentiel ou non essentiel. De la même façon que pour les autres enzymes décrites précédemment, d'autres éléments permettent son activation tel que des modifications génétiques pour les transporteurs d'acide aminé, des composés induisant un

changement de la synthèse des acides aminés ou la modification de ARNt. L'étude de cette kinase a montré qu'elle était plus généralement sensible à des variations métaboliques comme la privation du glucose ou une exposition à une forte teneur en sel, des irradiations et les histones désacétylases. Outre le côté censeur métabolique cellulaire, différentes protéines pourraient en se liant directement ou non à la protéine réguler l'activité de GCN2, comme GCN1 ou des kinases en réponse par exemple aux dommages ADN causés par l'irradiation aux UV.

1.5.1.1.5 MARK2

Très récemment, en janvier 2021, une cinquième kinase phosphorylant eIF2- α a été identifiée (Lu et al., 2021). En effet, Lu et collaborateurs montrent dans un contexte de stress protéotoxique la capacité de la *microtubule affinity-regulating kinase 2* (MARK2) à phosphoryler eIF2- α et à initier la voie de réponse au stress. Si la diminution de la synthèse protéique avec l'activation de MARK2 a été décrite par le passé (Monteverde et al., 2015), ce n'est qu'en janvier 2021 qu'il est montré que la phosphorylation de MARK2 par la PKC δ induit l'activation de MARK2. Celle-ci phosphoryle eIF2- α sur sa sérine 51 en réponse à des stress protéotoxiques induits par la tunicamycine, de l'arsénite de sodium ou encore par une augmentation d'un stress oxydatif.

Ces 5 kinases ciblant Ser⁵¹-eIF2 α ont la même fonction et peuvent agir en collaboration afin de d'orienter la réponse spécifique aux différents stress incriminés et la diminution de la production globale de protéines par la régulation de la traduction.

1.5.1.2 Régulation de la traduction

Le mode de traduction Cap ou non-Cap dépendante dépend du niveau de phosphorylation de eIF2 α .

1.5.1.2.1 Traduction Cap-dépendante

La traduction Cap-dépendante est le mode de synthèse protéique de la majorité des protéines cellulaires. Les ARNm de ces protéines possèdent une modification de leur extrémité 5' qui est appelé coiffe (ou Cap). Cette modification consiste en la présence d'une guanosine méthylée en position 7, la coiffe est ainsi notée 7mGpppN.

La présence de eIF2 α est requise pour l'initiation de la traduction. Cette traduction Cap-dépendante est composée de plusieurs étapes (**Figure 13**)

- eIF2 α est nécessaire pour la formation du complexe ternaire constitué de 3 sous-unités de eIF2 (α , β , γ), GTP et Met-tRNA.
- Ce complexe ternaire se lie aux cofacteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et à la sous-unité 40S du ribosome pour former le complexe de pré-initiation 43S.
- Le complexe de pré-initiation 43S se lie à un ARNm au niveau de la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ARNm.
- Le complexe de pré-initiation scan en direction 3' de l'ARNm jusqu'à atteindre le codon d'initiation (start codon)
- Durant ce processus, le GTP lié à eIF2 est hydrolysé en GDP et en un phosphate. La reconnaissance du codon d'initiation libère le phosphate de eIF2 résultant en la formation du complexe eIF2-GDP qui se dissocie alors de la sous-unité 40S.

Le complexe eIF2-GDP étant inactif, le recyclage de eIF2-GDP en complexe actif eIF2-GTP est réalisé par le facteur eIF2 β qui permet l'échange du GDP par un GTP. La formation du complexe actif eIF2-GTP permet une nouvelle initiation de la synthèse protéique.

Dans les cellules exposées au stress, l'augmentation de la phosphorylation de eIF2 α empêche le remplacement du GDP par le GTP dans eIF2. En effet, eIF2 α phosphorylé a un rôle d'inhibiteur compétitif de eIF2B résultant à une inhibition globale de la synthèse protéique.

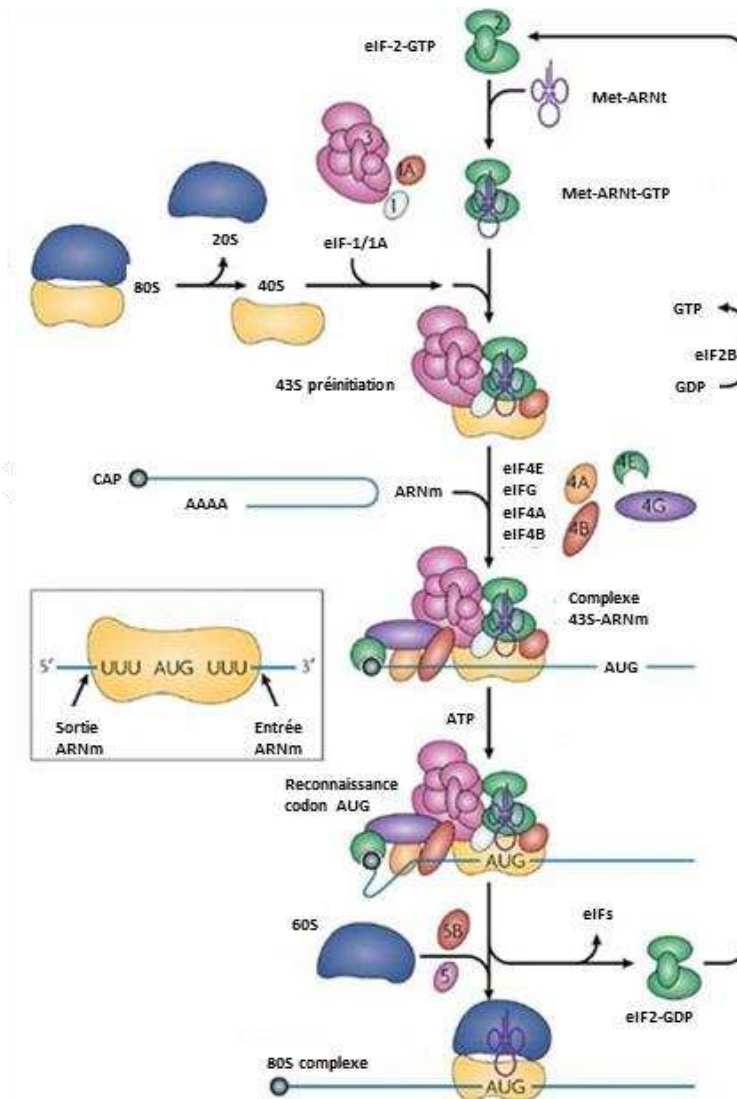


Figure 13 : Formations des complexes d'initiation de la traduction

eIF : eucaryotic Initiation factor ; *ARNT* : ARN de transfert ; *GTP* : Guanosine triphosphate ; *GDP* : Guanosine diphosphate ; *ATP* : adenosine triphosphate

1.5.1.2.2 Traduction non-Cap Dépendent

En réponse à l'activation de l'ISR, la phosphorylation de la sous-unité alpha de eIF2 bloque le recyclage du GDP en GTP empêchant la formation du complexe d'initiation de la traduction, ce qui a pour conséquence l'atténuation de la synthèse protéique cap dépendante. Cette atténuation de la synthèse protéique Cap-dépendante permet de préserver la cellule de la synthèse de protéines potentiellement mal conformées ou de l'accumulation de ces

protéines aggravant potentiellement le stress. La diminution de la traduction Cap-dépendante permet à la cellule de traduire des protéines non traduites en l'absence de stress, et notamment des protéines impliquées dans la réponse au stress. Cette traduction protéique non-Cap dépendante est dépendante de la présence de plusieurs uORF(s) dans l'extrémité 5' de ces ANRm. Parmi ces protéines se trouve ATF4 qui possède plusieurs uORFs (Iwawaki et al., 2017). En absence de stress, le complexe de pré-initiation 43S reconnaît la première séquence uORF de l'ARNm d'ATF4, puis la deuxième. Le second uORF chevauche la séquence codante de la protéine ATF4, la fixation du complexe de pré-initiation 43S sur ce second diminue la synthèse d'ATF4 (Iwawaki et al., 2017). Lorsque eIF2 α est phosphorylé, la quantité de eIF2-GTP est limitée, la réinitiation de la traduction après le premier uORF est donc plus lente. Ainsi les ribosomes initient la traduction du premier uORF empêchant la réinitiation sur le second augmentant ainsi la synthèse d'ATF4 (Iwawaki et al., 2017).

ATF4 n'est pas la seule protéine dont la synthèse protéique est dépendante de la traduction Cap-dépendante. Parmi ces autres protéines, nous pouvons citer les facteurs de transcription *C/EBP Homologous Protein* (CHOP ou DDIT3), ATF3 mais également la sous unité régulatrice de PP1c, PPP1R15A.

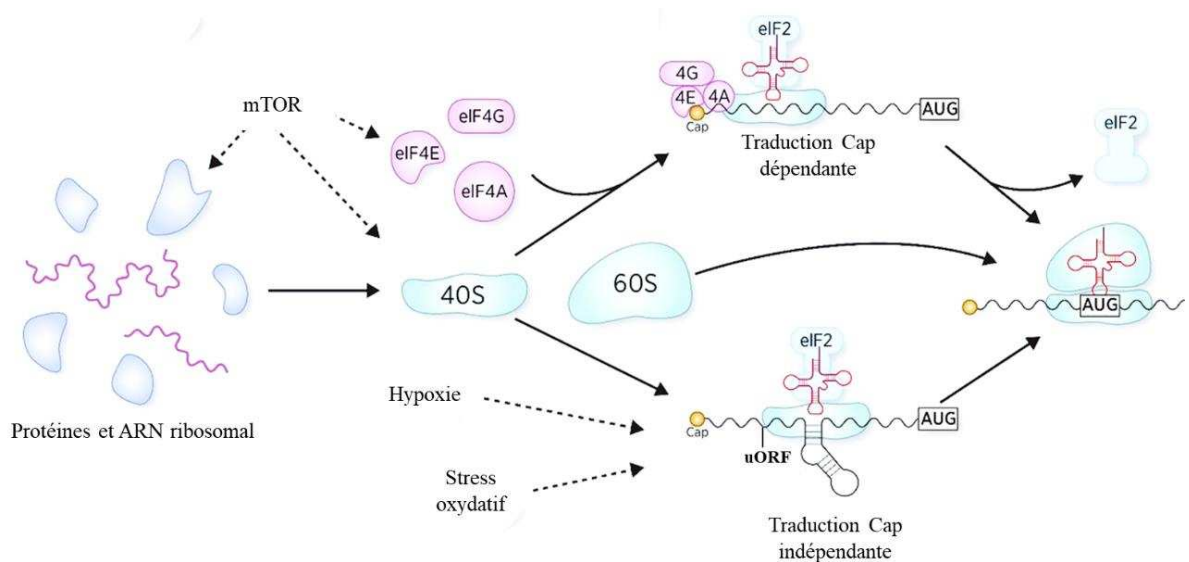


Figure 14 : Traduction Cap dépendante ou Cap indépendant. D'après (Micalizzi et al., 2021).

mTOR : mechanistic target of rapamycin ; *eIF* : eucaryotic initiation factor ; *uORF* : upstream open reading frame

1.5.1.3 Régulation de la traduction par le niveau de phosphorylation de eIF2 α

Comme décrit précédemment, eIF2 α et plus précisément son niveau de phosphorylation régule le mode de traduction protéique, Cap ou non-Cap dépendent. Deux complexes phosphatases ont été décrits pour déphosphoryler eIF2 α . Ces 2 complexes ont en commun la sous unité catalytique de la phosphatase PP1c mais diffèrent par leur sous-unité régulatrice : PPP1R15B (ou CReP) ou PPP1R15A (ou GADD34). PPP1R15B est exprimé de manière constitutive et en se complexant à la sous unité catalytique PP1c, est responsable de la déphosphorylation de eIF2 α en condition normale dans la cellule. PPP1R15A est lui exprimé en condition de stress sous l'influence du facteur de transcription ATF4 (Carrara et al., 2017; Reid et al., 2016). Ces deux sous-unités régulatrices ont en commun leur domaine C-terminal, qui permet leur liaison à la sous-unité catalytique PP1c. Par ailleurs, l'actine G a été décrite pour être le troisième partenaire de ce complexe PPP1R15A/PP1c en augmentant la spécificité du complexe enzymatique (Brush et al., 2003; Carrara et al., 2017).

Les souris dont le gène PPP1R15A a été invalidé sont viable et fertile (Kojima et al., 2003; Novoa et al., 2003; Patterson and Samuel, 1995). Ces souris ont été décrites pour être protéger contre les lésions rénales provoquées à l'injection d'un stresseur du ER, la tunicamycine (Marciniak et al., 2004). La perte du gène PPP1R15B chez la souris provoque la mort des souriceaux peu de temps après leurs naissance (Harding et al., 2009). Le double knock-out de PPP1R15A et PPP1R15B provoque un phénotype plus sévère, avec l'absence de détection d'embryons de souris dû à un défaut d'implantation (Harding et al., 2009).

Le complexe phosphatase PPP1R15A/PP1c est exprimé seulement en condition de stress. En effet, PPP1R15A est une protéine composée de 674 acides aminées dont la synthèse est sous le contrôle, comme ATF4, de la traduction non-cap dépendent par la présence de séquences uORFs dans son ARNm. La protéine est composée d'un domaine d'adressage au RE en N-terminal (Brush et al., 2003) puis d'une séquence composée de quatre éléments répétés (d'environ 50 acides aminés) permettant la liaison à eIF2 α , et enfin en C-terminal du domaine d'interaction avec PP1c (Brush et al., 2003; Choy et al., 2015).

L'une des fonctions connues de PPP1R15A est son rôle dans l'ISR et notamment dans la régulation de la boucle de rétroaction négative afin de restaurer une synthèse protéique et

une activité normale de la cellule une fois le stress résolu. En effet, l'association de PPP1R15A à PP1c permet la déphosphorylation de eIF2 α à la suite d'un stress. Cette déphosphorylation permet alors la levée de l'inhibition de la traduction Cap-dépendant. Les fonctions de PPP1R15A ne se limitent pas à la déphosphorylation de eIF2 α , PPP1R15A a été démontré pour avoir un rôle dans la production d'interféron de type 1 et de cytokines pro-inflammatoire participant ainsi à la réponse antimicrobienne (Perego et al., 2018) PPP1R15A a également été démontré pour avoir un rôle pro-apoptotique par l'inhibition de la voie AKT/mTor (Farook et al., 2013). PPP1R15A est également impliqué dans la régulation de l'autophagie (Gambardella et al., 2020).

1.5.1.4 Conséquences de l'activation de la voie de réponse intégrée au stress

Comme décrit précédemment, le but de l'activation de l'ISR est d'induire une réponse adaptée de la cellule au stress subi par celle-ci afin que la cellule puisse résoudre le stress, survivre et assurer ces fonctions cellulaires. L'activation l'ISR par une infection virale, ou par le LPS induit la phosphorylation de eIF2 α , une augmentation de la traduction non-Cap-dépendante et une diminution de la synthèse protéique Cap-dépendante, dont notamment la synthèse de I κ B. Cette diminution de I κ B déstabilise le complexe NF- κ B-I κ B favorisant ainsi la transcription de gènes cytokiniques (Baird and Wek, 2012; Gu et al., 2014). L'activation de l'ISR par un stress oxydatif ou l'hypoxie induira, via ATF4, une activation de la voie NRF2 et l'expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante (Cullinan and Diehl, 2006; Liu et al., 2008; Rzymiski et al., 2009). L'activation de l'ISR par une privation en nutriment induira via ATF4, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse en acide aminé. Enfin, l'activation de l'ISR par l'accumulation de protéines mal ou non conformées induira une diminution de la synthèse protéique et l'expression de chaperonnes, de gène impliqué dans l'autophagie, *via* entre autres ATF4.

L'effet de l'activation de l'ISR dépend non seulement de la nature du stress, de sa durée, et de sa gravité, mais surtout du niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Il est communément admis qu'un ISR de courte durée est plutôt en faveur d'une réponse adaptative et pro-survie cellulaire visant à résoudre le stress et à restaurer l'homéostasie, tandis qu'un ISR prolongé ou non adapté peut induire la mort cellulaire.

1.5.1.5 Implication en physiopathologie

Cette voie de signalisation de réponse au stress étant ubiquitaire, son activation a été démontrée dans de nombreuses pathologies aussi bien chroniques qu'aiguës. En effet, l'expression de protéines telles que ATF4, CHOP ou la forme phosphorylé d'eIF2 α qui indique une activation de l'ISR, a été observée dans les cancers, dans les maladies neurodégénératives de type maladie Charcot Marie Tooth (Bai et al., 2018), sclérose latérale amyotrophique (Hetz et al., 2009; Ilieva et al., 2007; Ito et al., 2009; Oyanagi et al., 2008; Sasaki, 2010), sclérose en plaque (Cunnea et al., 2011; McMahon et al., 2012; Mycko et al., 2004; Ní Fhlathartaigh et al., 2013), ou encore la maladie de Parkinson (Hoozemans et al., 2007; Sun et al., 2018), mais également dans le diabète ou les troubles métaboliques (Mohan et al., 2019). Une activation de l'ISR a également été mise en évidence dans des pathologies aiguës le plus souvent inflammatoire associée aussi à des états de stress oxydant important (Lucke-Wold et al., 2017).

Dans le cadre des maladies chronique, toutes ces pathologies ont en commun une activation de l'ISR à la suite d'un ou plusieurs stress comme à une accumulation de protéines mutées ou mal conformées, c'est le cas pour la maladie de Charcot Marie Tooth ou la sclérose latérale amyotrophique, ou à la suite d'une inflammation par exemple dans le cas de la sclérose en plaque, ou encore par un stress oxydatif comme dans la sclérose latérale amyotrophique. Dans ces pathologies, l'activation de l'ISR, la diminution transitoire de la synthèse protéique globale par la boucle de rétrocontrôle de la déphosphorylation de eIF2 α et l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress ne sont pas suffisants en durée et en intensité pour résoudre le stress et ses conséquences cellulaires. De nombreuses études *in vivo* et ou *in vitro* ont montré que la modulation de l'ISR par des approches génétiques ou pharmacologiques peuvent améliorer le phénotype de modèle cellulaire ou animal de pathologies chroniques. Par exemple, l'inhibition génétique ou pharmacologique du complexe phosphatase, exprimé spécifiquement durant le stress, PPP1R15A/PP1c a démontré des effets bénéfiques, aussi bien des effets moteurs que sur la survie, dans des modèles animaux de la maladie de Charcot Marie Tooth (D'Antonio et al., 2013; Das et al., 2015), la sclérose en plaque (Chen et al., 2019) ou encore de la sclérose latérale amyotrophique (Ghadge et al., 2020; Jiang et al., 2014; Wang et al., 2014).

De nombreuses pathologies aiguës, impliquant souvent un état inflammatoire important, présente également une activation de l'ISR, c'est le cas notamment des traumatismes, des états de chocs septiques ou hémorragiques (Ferrè et al., 2019; Lucke-Wold et al., 2017; Perego et al., 2017; Xu et al., 2020). Dans les différents modèles animaux d'ischémies liés à un choc traumatique, de sepsis ou encore d'hépatite fulminante, la modulation de l'ISR et notamment la prolongation de la phosphorylation de eIF2 α par l'utilisation de salubrinal ou de guanabenz, permet de réduire le stress du RE, réduire l'inflammation et l'apoptose (Logsdon et al., 2014; Lucke-Wold et al., 2017 ; Logsdon et al., 2014; Xu et al., 2020, Ferrè et al., 2019, Perego et al., 2018, 2017)

Ces résultats encourageants, aussi bien dans les pathologies chroniques que aiguës permettent d'envisager l'utilisation d'une approche pharmacologique pour moduler le niveau de phosphorylation de eIF2 α dans les maladies où une activation inadaptée de l'ISR est observée.

1.5.1.6 Modulateurs de la voie de l'ISR

Plusieurs molécules pharmacologiques ont été décrites pour moduler l'activation de l'ISR et notamment le niveau de phosphorylation de eIF2 α . Ces molécules peuvent cibler indirectement ou directement la voie de l'ISR (**Tableau 6**).

1.5.1.6.1 Modulateurs ciblant indirectement la voie de l'ISR

Une des approches consiste à inhiber des voies de dégradation des protéines du réticulum endoplasmique dans les tumeurs pour induire une mort cellulaire ciblée. Cet objectif peut être atteint en inhibant l'activité du protéasome comme le fait le Bortezomib en se liant à la sous-unité $\beta 1$ du protéasome 26S avec un peptide (Obeng et al., 2006). Le Bortezomib a montré une certaine efficacité dans le traitement du myélome multiple (Ibarra et al., 2021). Les causes de la mort cellulaire induite par le Bortezomib sont encore incomplètement comprises mais impliqueraient plusieurs voies, dont celle du stress du RE (Obeng et al., 2006).

La régulation de la conformation des protéines, particulièrement par les chaperonnes, est également une cible thérapeutique. Pour reprendre l'exemple de cancers où l'on veut exacerber le stress pour induire la mort cellulaire, la diminution de l'activité des chaperons moléculaires fait partie des stratégies envisagées à des visées antitumorales (Zhao et al., 2020). Cela est renforcé par l'idée que l'expression GRP78 favoriserait la survie cellulaire tumorale et serait donc impliquée dans le développement de métastases et de résistances à la chimiothérapie (Zhao et al., 2020). Sur des modèles *in vitro*, l'inhibition de l'expression de GRP78 présente un fort potentiel cytotoxique (Wu et al., 2020). Il est à noter que GRP78 n'est pas la seule chaperonne à être ciblée par des inhibiteurs, parmi ces dernières, nous pouvons citer l'HSP90 ciblé par des dérivés moins toxiques de l'antibiotique geldanamycine ou le radicicol (Gorska et al., 2012). Cependant pour des utilisations concrètes, ces molécules ont tendance à manquer de spécificité et le ciblage peut s'avérer compliqué.

Dans les pathologies où une diminution du stress est recherchée, l'utilisation de chaperonnes de synthèse peut être envisagé.

Les plus documentés, et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA), sont le 4-phénylbutyrate (4-PBA), l'acide tauro-urso-désoxycholique (TUDCA) (Uppala et al., 2017). Cette approche montre également une diminution du stress du RE au niveau hépatique chez des souris obèses et une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la gestion de la glycémie et du métabolisme du glucose (Coucha et al., 2017; Min et al., 2019). Ce type d'approche visant à réduire le stress du RE dans un large éventail de maladies peut être alors intéressante. Pour autant l'élucidation des mécanismes d'action de ces approches reste à être déterminé.

1.5.1.6.2 Moduleurs directs de l'ISR

La modulation directe de la phosphorylation de eIF2 α et donc de l'activation de l'ISR peut se faire de 2 manières : moduler l'activité des kinases ou moduler l'activité de la phosphatase PPP1R15A/PP1c responsable de la déphosphorylation de eIF2 α .

La première approche consiste à cibler les kinases responsables de la phosphorylation de eIF2 α ou leur activité. Pour exemple la phosphorylation de PERK peut être ciblée par des molécules comme le GSK2606414 et son dérivé le GSK265157. Ce dernier est décrit pour être un inhibiteur compétitif de PERK (Axten et al., 2013; Rojas-Rivera et al., 2017). L'administration *per-os* du GSK2606414 ou de son homologue a prouvé être à l'origine de la diminution de la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe du cancer du pancréas. Ces activités bénéfiques seraient liées à l'altération du métabolisme des acides aminés et de la perfusion vasculaire (Rojas-Rivera et al., 2017).

La seconde stratégie consiste à cibler directement la déphosphorylation de eIF2 α . Le salubrinal ainsi que ses dérivés comme le Sal0003 ont été montrés pour inhiber la déphosphorylation de eIF2 α médiés par les 2 complexes de phosphatases PPP1R15A/PP1c et PPP1R15B/PP1c (Boyce et al., 2005). A l'heure actuelle, leurs activités inhibitrices directes sur les 2 complexes phosphatases n'ont pas été démontrés. La perte des gènes PPP1R15A et PPP1R15B chez la souris étant létale, l'utilisation du salubrinal en clinique n'est pas envisageable.

La troisième stratégie est d'inhiber spécifiquement le complexe phosphatase PPP1R15A/PP1c. Deux molécules, le guanabenz et son dérivé la Sephin1 (Das et al., 2015; Tsaytler et al., 2011), ont été décrites pour inhiber spécifiquement le complexe phosphatase PPP1R15A/PP1c même si leur spécificité *in vitro* a été remise en cause par certains groupes (Crespillo-Casado et al., 2018). Le guanabenz, une molécule pharmacologique approuvée par la FDA, fut utilisée en clinique comme un agoniste du récepteur α 2-adrénergique pour le traitement de l'hypertension artérielle (Wytensin). L'administration de guanabenz dans divers modèles animaux de la sclérose en plaque, de la maladie de Parkinson (Chen et al., 2019), sclérose latérale amyotrophique (Jiang et al., 2014; Wang et al., 2014) ou encore de l'hépatite fulminante (Perego et al., 2017) a montré des effets bénéfiques sur les paramètres

moteurs et la survie de ces animaux. Une phase 2 d'essai clinique sur la sclérose latérale amyotrophique a montré des résultats encourageants (Bella et al., 2021). Le guanabenz ayant une activité hypotensive, rend son utilisation difficile pour le traitement d'autres maladies que l'hypertension. La Sephin1 n'a pas cette activité agoniste sur le récepteur $\alpha 2$ -adrénergique. La Sephin1, ou IFB-088, a été démontré pour améliorer le phénotype des souris atteintes de la maladie de Charcot Marie Tooth (Das et al., 2015, InFlectis BioScience datas), de la sclérose latérale amyotrophique (Das et al., 2015) et de la sclérose en plaque (Chen et al., 2021). Après avoir complété une phase 1 d'essai clinique, cette molécule, sous le nom d'IFB-088, la Sephin1 est développée actuellement par la société InFlectis Bioscience pour les maladies neurodégénératives : la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Charcot Marie Tooth. Par un programme de chimie médicinale en utilisant la stratégie SOSA (Selective Optimization of Side Activity ; Wermuth, 2006), InFlectis Bioscience a identifié d'autres dérivés du guanabenz ciblant l'ISR, dépourvus d'activité agoniste du récepteur alpha-2 adrénergique et qui prolonge la phosphorylation de eIF2 α en condition uniquement de stress. Certaines de ces molécules ont démontré leur efficacité dans un modèle animale de sepsis (données d'InFlectis BioScience). L'identification de molécules qui prolongent uniquement en condition de stress la phosphorylation de eIF2 α et avec des propriétés pharmacocinétiques différentes (demi-vie, exposition dans le tissu cible) permet leur utilisation dans diverses pathologies aussi bien chronique qu'aigüe où le niveau de réponse au stress est maladapté.

Tableau 6 : Liste des principales molécules décrites afin de moduler la voie de réponse au stress

Cibles	Molécules	Modes d'action	Classes de molécule
PERK	GSK2656157 et GSK2606414	Cible le site de liaison à l'ATP	Inhibiteur
ER Stress	4-PBA	Diminue l'ER stress	Chaperonne de synthèse
	TUDCA		
PKR	C16 C22 2-Aminopurine	Cible le site de liaison à l'ATP	Inhibiteurs
GCN2	6D 6E (aka GCN2 Δ A)	Cible le site de liaison à l'ATP	Inhibiteurs
PERK	CCT020312 *	Active PERK	Activateur
N-glycosylation	Tunicamycin *	Induction de RE stress par inhibition de la N-glycosylation	Inhibiteur
Protéasome	Bortezomib *	Induction de RE stress par inhibition du protéasome	Inhibiteur
PKR	Interferon * poly I:C *	Augmente l'expression de PKR Mimétisme d'ARN	Activateurs
GCN2	Histidinol *	Inhibe l'histidinyl-tRNA synthetase	Inhibiteurs
	Tryptophanol *	Inhibe la tryptophan-tRNA synthetase	
	Halofuginone * L-asparaginase *	Inhibe la prolyl-tRNA synthetase Induit une déplétion en arginine	
PPP1R15A	Salubrinal *		Inhibiteurs
	Guanabenz *	Inhibe l'activité du complexe PPP1R15A/PP1c	
	IFB/088 Sephinl *		
PPP1R15A and B	Jasplakinolide *	Depletion en actin-G	Inhibiteur

*PERK : protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; HRI : heme-regulated inhibitor; GCN : general control nondepressible; eIF : eukaryotic initiation factor ; 4-PBA: 4-phenylbutyric acid; ER : endoplasmic reticulum; UPR : unfolded protein response; TUDCA : tauroursodeoxycholic acid; C16 : CAS 608512-97-6 [6,8-dihydro-8-(1H-imidazol-5-ylmethylene)-7H-pyrrolo[2,3-g]benzothiazol-7-one]; C22 : CAS 852547-30-9 (5-chloro-3-[(3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl)methylidene]-2,3-dihydro-1H-indol-2-one); CCT020312 : [6-bromo-3-[5-(4-bromo-phenyl)-1-(3-diethylamino-propionyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl]-4-phenyl-1H-quinolin-2-one. Sont indiqués avec * les activateurs de la voie de réponse intégrée au stress*

1.6 Intérêt au traitement dans le SRIS et dans les assistances circulatoires

L'inflammation systémique observée durant un SRIS est très souvent accompagnée d'atteintes hépatiques, rénales ou cérébrales. L'inflammation a pour conséquence au niveau cellulaire une augmentation du stress oxydative associée potentiellement à une diminution en apport nutritif ou oxygène. Ces stress que sont l'inflammation, le stress oxydatif, la diminution en apport nutritif ou l'oxygène ont tous la capacité d'activer les eIF2 α kinases et donc d'induire l'ISR. Dans le cas de la circulation extracorporelle comme nous l'avons vu précédemment il existe un dysfonctionnement des organes associés à une inflammation systémique importante qui peut être associée à des troubles de l'homéostasie du tissu sanguin et à l'apport de toxines bactériennes. Ce sont d'autant plus de facteurs activateurs de l'ISR.

Récemment, l'équipe de Clavier et collaborateur a montré la présence d'un faible stress du RE associés avec l'apparition de dysfonction multi organes chez les patients subissant un by-pass cardio-pulmonaire durant une chirurgie cardiaque (Clavier et al., 2021).

La présence d'un stress du RE et des stress de type inflammatoire, hypoxique, stress oxydative dans le SRIS et chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque avec une circulation extracorporelle suggèrent que l'ISR est activée. Dans ce contexte, cibler l'ISR pourrait avoir des bénéfices aux niveaux des atteintes multi-organes.

1.7 Objectif et déroulé de l'étude

Le travail de cette thèse a consisté à évaluer le bénéfices de cibler l'ISR par des inhibiteurs du complexe PPP1R15A/PP1c (ou GADD34/PP1c) développés par InFlectis BioScience sur les conséquences d'une circulation extracorporelle. Pour cela, le projet s'est articulé en plusieurs parties allant de la mise au point, à l'évaluation et à la validation du modèle de CEC généré, notamment avec la comparaison des effets d'une CEC sur une cohorte de patients. Enfin, les petites molécules ont été testés *in vivo* sur le modèle validé.

Un pool de molécules dérivés du IFB-088 a été sélectionné par l'entreprise pour la suite de l'étude. Ces molécules ont été choisies en fonction de leurs propriétés et critères qui pourraient être intéressants dans le contexte de la CEC. Les critères recherchés sont d'ordres : pharmacodynamique, pharmacocinétique comme un temps de demi-vie permettant de

couvrir la durée de la CEC, une absence de toxicité aux doses à administrer ainsi qu'une absence souhaitée d'activités aspécifiques.

Afin de vérifier que ces molécules avaient une activité intéressante sur un stress type inflammatoire que l'on peut retrouver dans le SRIS durant une CEC, les molécules ont été testées sur des PBMC de rats exposés à du lipopolysaccharide. L'activité recherchée de ces molécules étaient l'amélioration *in vitro* de l'inflammation et la modulation de la voie de l'ISR. La molécule présentant une efficacité plus importante a été choisie pour un premier test *in vivo* sur le modèle de CEC. À la suite de l'apparition d'un effet hypotenseur inattendu (*off target*) de cette molécule, 3 autres molécules ont été testées sur des rats vigiles. Les 2 molécules ne présentant pas d'effet hypotenseur ont été testées sur le modèle de CEC.

En parallèle, et afin de confirmer la pertinence du modèle, les différents paramètres de ces derniers ont été comparé avec ceux mesurés dans une cohorte de 41 patients ayant reçu une chirurgie cardiaque sous circulation extra-corporelle.

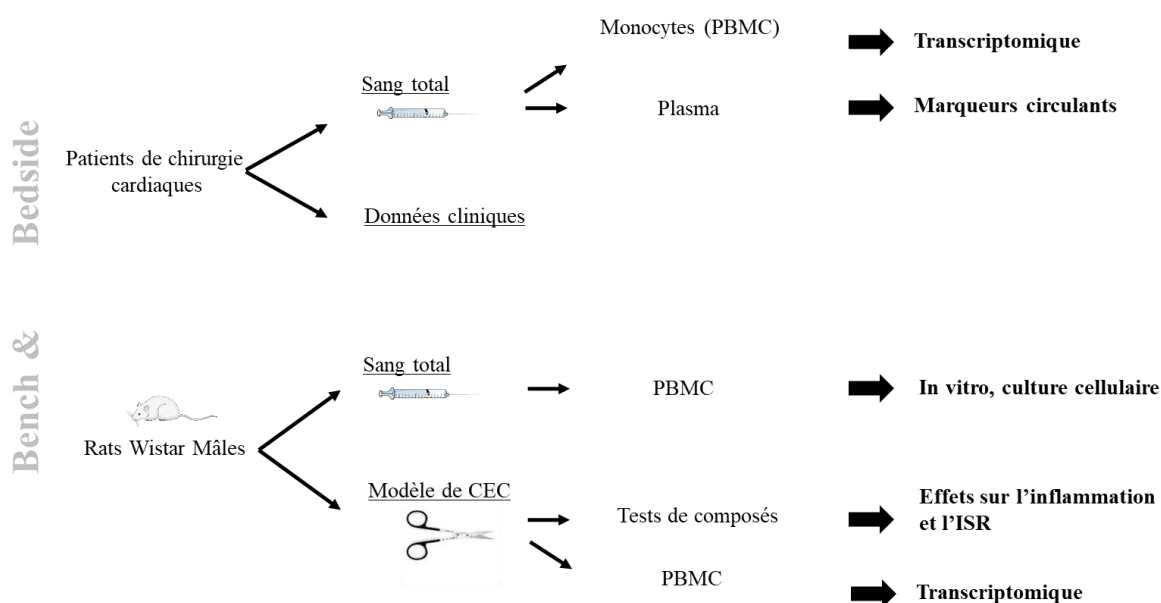


Figure 15 : Déroulé de l'étude

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells* ; CEC : circulation extracorporelle ; ISR : *integrated stress response pathway*

2 Méthodes

2.1 Expérimentation animal et déclaration Ethique

L'ensemble des procédures d'expérimentation animale sont réalisées en conformité avec le comité d'éthique régional (protocoles 19562 et 13495, CEEA - Pays de la Loire, France) selon la directive 2010/63/EU de l'Union européenne et conformes aux directives ARRIVE actuelles. Les protocoles ont été réalisés sur des rats Wistar sains âgés de 15 ± 1 semaines (400 ± 50 g) fournis par le laboratoire Charles River France (les Oncins, France). L'unité de soins et d'hébergements des animaux a reçu les rats 15 jours avant la chirurgie pour acclimatation. Les animaux ont été maintenus en groupes de 2 ou 3 animaux à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec un taux d'humidité de $55 \pm 10\%$, selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures et un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture.

2.2 Tests des molécules *in vitro*

Toutes les molécules développées et fournies par InFlectis BioScience ont été testées *in vitro* sur des monocytes issus de rats stressés par du LPS en culture. Nous avons considéré plus pertinent d'effectuer cette première étape *in vitro* sur des cellules issues de l'espèce du modèle qui servira pour générer le modèle de CEC : le rat. Afin de montrer un possible effet des molécules dans l'inflammation dans le SRIS durant la CEC, il apparaissait logique d'effectuer les tests sur une population de cellules impliquée dans la genèse de ce SRIS : les cellules mononuclées du sang périphérique ou monocytes ou PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*). L'isolement des PBMC repose sur un principe simple : cette population cellulaire présente une densité moins importante que les éléments cellulaires lourds, tels que les hématies, et plus importante que le plasma et les plaquettes. La discrimination du plasma et des cellules se fait par centrifugation, néanmoins afin de séparer les PBMC des cellules de plus forte densité nous utilisons du Ficoll (Ficoll Paque premium, densité de 1,077, GE Healthcare, France), une solution ayant une densité intermédiaire. Après centrifugation avec le Ficoll, nous obtenons plusieurs couches distinctes, de la moins dense à la plus dense : le plasma avec les plaquettes, les PBMC formant un anneau, le Ficoll et enfin le culot globulaire rouge.

Cet ensemble complexe de cellules a donc été isolé à partir de sang total, mis en culture et exposés à différentes molécules :

- Du LPS (0,25 µg/mL, *E.coli* sérotype O111:B4) afin d'amorcer une réaction pro-inflammatoire par les monocytes. La concentration de LPS a été déterminée sur des PBMC isolés et mis en culture. Les PBMC en culture ont été exposés à des concentrations croissantes (0,1/0,25/0,5/1 mg/mL) de LPS solubilisés dans du PBS et comparés aux cellules recevant uniquement du PBS. La condition à 0,25 µg/mL a été sélectionnée car cette concentration génère une inflammation maximum en 3 heures sans perte majeure de la viabilité cellulaire
- Les molécules fournies par InFlectis BioScience afin d'observer leurs potentiels effets sur l'inflammation et l'expression de la voie de l'ISR

Les différentes molécules dont l'effet sur la voie de l'ISR et sur l'inflammation ont été testées *in vitro* sont les molécules que l'on nommera :

- IFB-088
- Cpd-2
- Cpd-3
- Cpd-4

Ces molécules ont été sélectionnées pour leurs propriétés pharmacologiques et pharmacodynamiques basée sur les données obtenues par InFlectis BioScience (données non présentées ici). En effet, la voie d'administration choisie devait pouvoir être compatible avec le protocole de circulation extracorporelle chez les rats puis transposable à l'Homme. Ces molécules doivent posséder un temps de demi-vie suffisant pour couvrir l'intégralité de la procédure c'est à dire de l'anesthésie de l'animal jusqu'à 5h après le réveil sans qu'il ne soit nécessaire d'en réadministrer.

2.2.1 Isolement des PBMC issus des rats et mise en culture des monocytes

2.2.1.1 Prélèvements de sang artériel

Le prélèvement terminal de 10 mL de sang total est réalisé sous anesthésie. Les rats sont d'abord anesthésiés à l'isoflurane (Iso-vet[®], Osalia, France) dans une chambre à induction avec un mélange isoflurane (5%) et air (1 L/min). L'anesthésie est ensuite maintenue pour le reste de la procédure par inhalation du mélange isoflurane (2%) et air (0,8 L/min) en ventilation spontanée via un masque. Le rat est alors placé en décubitus dorsal afin de dégager la partie ventrale du cou. Une incision de moins de 1 cm est effectuée en regard de la ligne médiane du cou de l'animal. A l'aide de pince, les glandes parotides et les tissus superficiels sont écartés afin de révéler le sterno-cléido-mastoïdien. Ce dernier est délicatement écarté par les pinces afin de mettre en évidence la trachée puis la carotide gauche. Cette dernière est isolée de sa loge musculaire et des nerfs attenants. La carotide gauche est ligaturée sur sa partie distale et clampée à sa partie proximale. Un cathéter (PE-50, Phymep, France) rempli de solution de Ringer Lactate (B. Braun, France) hépariné (50 UI, Héparine, Choay, France) est inséré dans la carotide par une incision réalisée entre le clamp et la ligature. Le sang artériel est alors prélevé par le cathéter dans une seringue 10 mL (Terumo, France). Les rats reçoivent alors une injection létale de pentobarbital sodique (>140 mg/kg, Euthasol, Dechra, France) par le cathéter en place.

2.2.1.2 Isolements des monocytes et mise en culture

Le sang prélevé est transféré dans un tube Falcon stérile de 50 mL et complété par 1 volume d'une solution stérile de D-PBS sans calcium ni magnésium (Dulbecco's Buffered Saline, Gibco[™], France) à température ambiante (TA). Le sang dilué au demi est homogénéisé par retournement successifs délicats du tube. En parallèle, 5 mL de Ficoll (Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare Life Sciences, France) est déposé dans 2 tubes Falcon de 15 mL. C'est sur cette couche de Ficoll que 10 mL de sang dilué au demi est déposé. Après 35 min de centrifugation à 600 g à TA, sans freins ni accélération brusque, la couche de plasma est éliminée et l'anneau de PBMC est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Les PBMC sont lavées deux fois par centrifugations douces (500 g) dans 50 mL de D-PBS stérile pour éliminer d'éventuels contamination par les plaquettes ou des hématies. Le culot cellulaire est repris dans le volume initial de sang (~10 mL) avec du milieu de culture : RPMI 1640 (Gibco, France) complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement chauffé à 37 °C. Après comptage sur lame de Malassez, les cellules sont réparties dans 6 puits de plaques stériles de culture cellulaires puis placés dans un incubateur à 95% O₂/ 5% CO₂ pendant 1 heure. Après une heure les composés, solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich, France) à 10 mM, sont ajoutées dans le milieu. Les groupes ne recevant pas de composés reçoivent la même quantité de DMSO. Après 1 heure de prétraitement, les cellules sont stressés par l'ajout de 0,25 µM de lipopolysaccharides (LPS, *E.coli* sérotype O111:B4, Sigma-Aldrich, France) pendant 3 heures.

Les différents puits accueilleront les différents groupes :

- Contrôles : cellules seules + DMSO
- LPS : cellules exposées au LPS + DMSO
- Traités : cellules exposées au LPS et prétraitées avec les molécules IFB

Après 3 heures d'incubations, le surnageant et les cellules sont collectés séparément par centrifugation. Le surnageant est congelé pour des études ultérieures dans des cryotubes (Eppendorf 1,3 mL) à -80°C. Les cellules sont lysées dans 600 µL de RLT plus (Qiagen, France) et conservée à -80 °C pour extraction des ARN en prévision de RT-qPCR.

2.3 Test de l'impact hémodynamiques des molécules IFB *in vivo*

Après l'apparition d'une bradycardie et d'une hypotension persistante inattendus chez les rats avec le cpd-2 sur le modèle de CPB développé au cours de cette thèse (développés dans une prochaine section), nous avons évalué l'impact hémodynamique des différents molécules chez le rat (n=3 / groupe) en limitant leurs expositions à d'autres composants pharmacologiques : injection du molécule en intrapéritonéale en vigile, 30 minutes après cette injection les rats ont subi la même procédure que 2.2.1.1. Dès lors et pendant 10 minutes la pression artérielle et la fréquence cardiaque ont été monitoré et analysés. Enfin, les animaux ont été sacrifiés par une injection de pentobarbital sodique (Euthasol®) à une dose >140 mg/kg en iv. Les différents groupes effectués ont été :

- Les contrôles exposés au solvant (DMSO 5%)
- Les groupes exposés aux molécules :
 - Les molécules de références : l'IFB-088 et une molécule présentant une activité Alpha 2 adrénergique connue
 - Les groupes exposés aux molécules que l'on souhaite tester par la suite.

2.4 Étude du modèle de rat

2.4.1 Préparation du circuit de dérivation cardio-pulmonaire

Le circuit de CEC consiste en un réservoir veineux ouvert (seringue modifiée de 10 mL ; Terumo) qui s'écoule vers un tube en Tygon® (diamètre interne, ID, 3,2 mm, 25 cm de long ; MasterFlex, ColePalmer, France) par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (3 rouleaux ; Watson-Marlow, Falmouth, Royaume-Uni). Ce tube alimentera un oxygénateur à membrane (oxygénateur Micro-1-rat ; Kewei Rising, Shenzen, Chine) (3,7 ml de volume mort). Le sang, oxygéné, passe ensuite par un robinet 3 voies avec valve anti-reflux permettant le prélèvement pour les mesures de gaz du sang (BG) et alimente la canule artérielle (microperfuseur 23G monté avec un cathéter PE-50 ; Artsana, France). Le réservoir veineux est équipé d'un port d'injection permettant l'injection des traitements et le remplissage avec une solution équilibrée de Ringer-Lactate (B. Braun, France). Un connecteur en Y (ID=1.6 mm) permettant l'arrivée du sang veineux par gravité depuis la

veine cave (Canule multi perforée ; NutriSafe 2 ; 6 Fr ; Vygon, France) et la perfusion de l'anesthésique pendant le CEC. Des ports d'injection ont été montés sur le réservoir veineux pour permettre la perfusion, le traitement ou l'administration de remplissage de propofol/fentanyl per-CEC. Enfin, un shunt a été mis en place entre le réservoir veineux et la ligne artérielle pour permettre l'élimination des bulles du circuit (**Figure 16**). Avant l'intervention, le circuit est purgé puis amorcé avec un total de 8 mL d'une solution de Ringer-Lactate équilibrée (B.Braun, France).

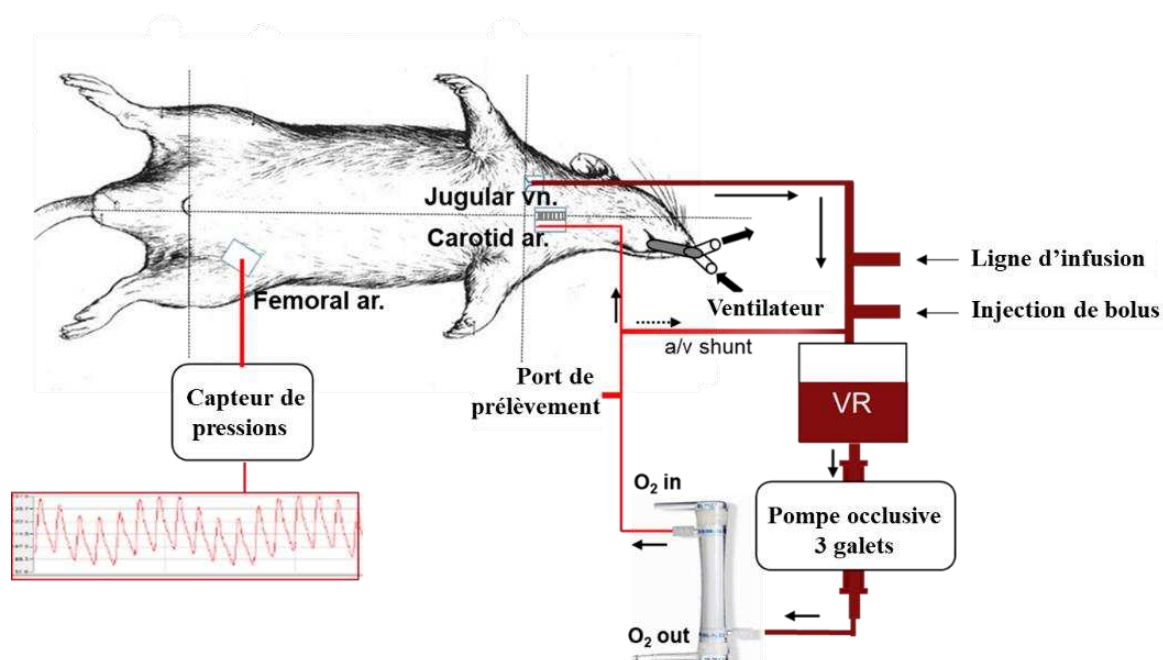


Figure 16 : schéma du montage de CEC chez le rat.

Le sang est récupéré par gravité dans un réservoir veineux (VR) par une canule d'admission insérée dans la veine jugulaire droite. Le sang est transmis à une membrane d'oxygénation par l'action d'une pompe occlusive ce qui permet de perfuser par la canule carotidienne du sang oxygéné/décarboxylé. Différents ports permettent les prélèvements ou l'injection/perfusion de molécules. Le monitoring hémodynamique est effectué par le cathéter artérielle fémorale. Le shunt a/v (artérielle/veineux) est mis en place en cas d'urgence.

2.4.2 Préparation des animaux : anesthésie et chirurgie, CEC/Sham, médicaments, sevrage

2.4.2.1 Préparation des animaux

Les procédures ont été effectuées selon les conditions d'asepsie réglementaires (NC3R, NIH guidelines, **Figure 16**, **Figure 17**). Les animaux ont été anesthésiés avec 5% d'isoflurane/FiO₂ 1,0 dans une boîte d'induction et ensuite maintenus avec un masque à 2% d'isoflurane. Une sonde rectale et une plateforme chirurgicale chauffante (Harvard Apparatus, Molliston, MA) ont été utilisées pour contrôler et maintenir la température des rats à 37,5°C ± 1°C pendant la chirurgie et à 36,5°C ± 1°C pendant la CEC. Les rats sont préparés pour la chirurgie, dans une zone servant uniquement à cette étape, en rasant largement les zones d'incisions et la peau est nettoyée avec 3 cycles de lavages successifs avec des bétadines dermiques et « scrub » (MYLAN MEDICAL, France) selon les recommandations des « *NIH guidelines* ». Un bolus de fentanyl (12 µg.kg⁻¹ ; Fentadon, Dechra, France) a été administré pour assurer un soulagement adéquat de la douleur pendant la chirurgie et a été injecté lentement dans la veine péniennne dorsale pour éviter toute insuffisance respiratoire. Dans un même temps, les rats reçoivent une injection en intrapéritonéale de molécules ou du solvant pour les groupes contrôles. Les molécules sont dissoutes dans du DMSO puis dilués dans du Ringer Lactates afin d'atteindre la concentration voulue en molécule et 5% de DMSO. Les rats sont ensuite transférés en zone de chirurgie ou « zone propre » et reçoivent une injection en intraveineuse (veine péniennne dorsale) de curare (rocuronium bromide, 1 mg/kg, iv, Mylan, France). Rapidement et avant la chirurgie, la mise en place de l'intubation orotrachéale (canule modifiée 14 G ; laboratoires Instech, Plymouth, USA) a permis de maintenir l'anesthésie avec de l'isoflurane à 1,5 % / FiO₂ 1,0. La ventilation mécanique a été réglée (modèle 683 de Harvard, appareil Harvard, Molliston, MA) avec un volume courant de 6 mL/kg et une fréquence respiratoire de 58 ± 2 cycles par minute. Pour obtenir une relaxation musculaire pendant la ventilation mécanique, les rats ont été curarisés par une injection iv de bromure de rocuronium (Esmeron, 1 mg/kg ; Hospira, France).

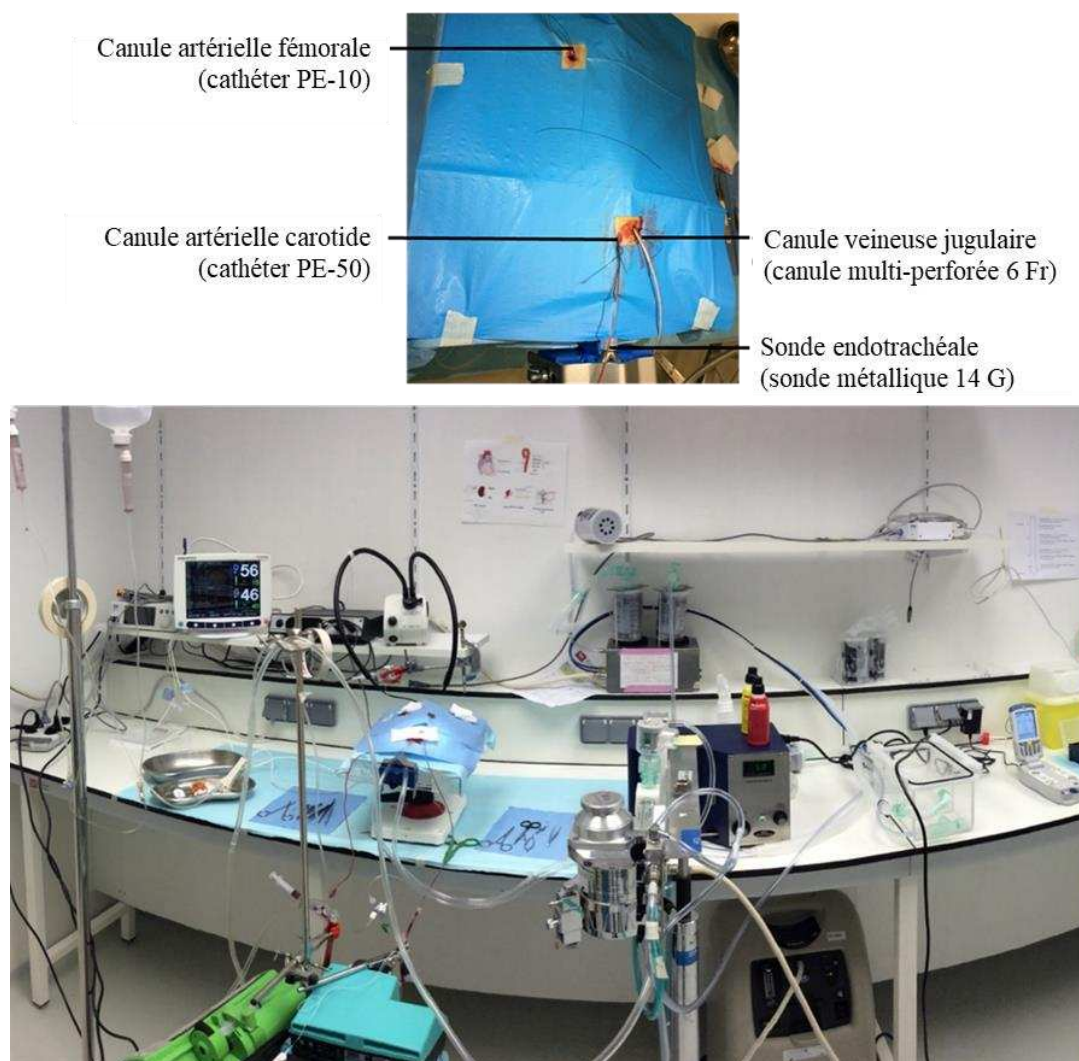


Figure 17 : Set-up expérimental et canulations pour la CEC chez le rat

Canulations et vue sur le champs opératoire avec les 3 canulations vasculaires et la sonde d'intubation (Image du haut) et organisation de la zone de chirurgie (en bas gauche) et de la zone de suivi de monitoring (en bas à droite).

2.4.2.2 Chirurgie

Trois canules, purgées puis préremplies de Ringer Lactate hépariné (30 UI/mL) ont été respectivement insérées dans l'artère fémorale gauche (PE-10 ; laboratoires Instech, Plymouth, USA) pour surveiller la pression artérielle systémique, dans la veine jugulaire droite (canule modifiée 6Fr, Vygon, France) ou canule d'admission pour l'aspiration du sang veineux et dans la carotide gauche (PE-50 ; laboratoires Instech, Plymouth, USA) pour

reperfuser les rats en sortie de CEC. De l'héparine non fractionnée (300 UI/kg ; Panpharma, Beignon, France) a été injectée dans la veine jugulaire avant le début de la CEC (**Figure 17**).

Initiation et maintien de la CEC : les canules artérielle et veineuse ont été connectées respectivement à la valve 3 voies située à côté de l'oxygénateur et du réservoir veineux. La pompe a été amorcée lentement, puis le clamp de la ligne veineuse a été retiré. La vitesse de la pompe a été augmentée jusqu'à ce que la cible minimale de 60 mmHg de la pression artérielle moyenne (PAM) soit atteinte. De la phényléphrine (15 µg ; Renaudin, Ixassou, France) a été administrée pour augmenter la pression sanguine systémique si besoin. L'anesthésie a été commutée sur une perfusion de propofol (30 mg/kg/h ; PropoVet, Abbott, France) associée au fentanyl (2 µg/kg/h) grâce à un pousse-seringue mécanique (PHD 22/2000, Harvard Apparatus, Molliston, MA).

Lors des étapes de mises au point, la CEC a d'abord été maintenue pendant 30 minutes. Les premiers résultats reproductibles concluant sur 3 animaux (CEC) comparés à des rats ayant reçu le même protocole sans initiation de la pompe de CEC (procédure Sham) ont permis d'affiner le protocole et de maintenir la circulation extracorporelle pendant 60 minutes pour le reste de l'étude. Il a été déterminé que cette durée était un bon compromis entre viabilité de l'animal en vue du sevrage et sévérité de la réponse des organes et durée de protocole.

Sevrage et reprise de l'anesthésie : Après 60 minutes de CEC, la voie d'admission veineuse a été clampée et le sang contenu dans la tubulure est restitué par la canule artérielle avant d'arrêter la pompe. L'anesthésie a été repassée à l'isoflurane 1,5%, FiO₂ 1,0 et la perfusion propofol/fentanyl stoppée. Les cathéters carotides, fémorale et jugulaire ont été retirés puis les abords vasculaires ont été ligaturées à l'aide de fils stériles 5/0 non résorbables (Silk ; B.Braun, France). Enfin, toutes les plaies ont été fermées par des sutures sous-cutanées (Vycril 5/0 non résorbable) afin que les rats ne puissent pas les retirer après le réveil. Les rats ont été maintenus sous anesthésie 10 à 15 minutes après le sevrage afin de récupérer complètement et être réchauffés à 37°C ± 0,5°C si nécessaire. Pour initier le réveil, l'isoflurane a été progressivement diminué à 1% puis 0%. Les rats ont finalement été extubés à l'apparition de signes de reprise de l'activité respiratoire spontanée et de luttés contre la sonde orotrachéale.

Objectif de la CEC : Les objectifs de cette circulation extracorporelle sont multiples. Les principaux objectifs sont de :

- Maintenir des pressions artérielles moyennes > 60 mmHg durant l'heure de CEC
- Limiter le remplissage vasculaire et donc l'hémodilution pour avoir une hématocrite $> 25\%$ durant la CEC
- Maintenir une $pO_2 > 90$ mmHg et une pCO_2 entre 35 et 50 mmHg et une saturation artérielle en O_2 , $SaO_2 > 95\%$
- Maintenir un pH entre 7,35 et 7,45 durant toute la procédure ainsi que les électrolytes dans les normales

2.4.2.3 Surveillance de la pression artérielle et de la température

Après la préparation stérile des animaux, la pression artérielle systémique, PAD, PAM et PAS (**Figure 5**) et la fréquence cardiaque ont été enregistrées en continu tout au long de la procédure avec le logiciel IOX 2.9 (EMKA Technologies, Paris, France). Après l'intubation orotrachéale, la pression sanguine a été enregistrée directement par le cathéter de l'artère fémorale.

2.4.2.4 Soins postopératoires, surveillance et bio collection

Les rats sevrés de l'anesthésie ont été placés dans une chambre chauffée ($30^\circ C$) avec une hygrométrie contrôlée et maintenue à 70% après avoir reçu une fluidothérapie sous-cutanée (10 mL.kg^{-1} , NaCl 0,9%, B. Braun, France) complétée avec de la Buprénorphine ($0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$, Buprecare®, Axience, France).

Durant la période du réveil jusqu'à 5 heures post-extubation l'activité des rats est monitorée et tous les éléments comportementaux inhabituels sont notés. Ces paramètres sont intégrés dans deux scores différents : un score d'évaluation de la fonction cérébrale et un score de développement de dysfonction multi-organes qui permettront de comparer

simplement l'état globale des rats (**Tableau 7**). Le score permettant d'évaluer la fonction cérébrale et réflexe des rats est inspiré du score de Glasgow chez l'Homme et prend en compte :

- La prise de boisson ou alimentaire
- La motricité de l'animal
- La motricité oculaire en réponse à un stimuli lumineux et sonore
- La présence de mouvements spontanée
- La réactivité au toucher ou à un stimulus sonore
- La peur/évitement au toucher : utilisé comme point limite
- La vocalise au toucher : utilisé comme point limite

Cinq heures après l'extubation (H+5), la pression artérielle des rats est mesurée pendant 10 à 15 minutes grâce à un cathéter inséré dans l'artère carotide droite sous anesthésie à l'isoflurane (1,5%, FiO₂ 1,0). Les rats sont ensuite sacrifiés et le cœur, le rein gauche, les lobes pulmonaires gauches, le lobe supra-rénale du foie, le cerveau, le sang et du plasma ont été prélevés et congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C pour des expérimentations ultérieures. Le rein droit est récupéré et lavé sectionné longitudinalement puis conservé dans de la formaline 5% pour les études histologiques. Le lobe pulmonaire droit est excisé par section de la bronche primaire droite. Par cette dernière 4 mL de formaline 5% pour remplacer l'air pulmonaire et fixer le tissu, puis le lobe est conservé de la même façon que le rein.

Tableau 7 : Score d'évaluation de la dysfonction multi-organe, inspirée du score SOFA

Score d'évaluation de dysfonction multi-organe		0	1	2
Respiratoire	Fréquence respiratoire (rpm)	Moyenne $\pm$ SD (SHAM)	> ou < Moyenne $\pm$ 1,5 x SD (SHAM)	> ou < Moyenne $\pm$ 2,0 x SD (SHAM)
	Qualité	Normal	Anormale	
Cardio-vasculaire	Pression artérielle moyenne (mmHg)	Moyenne $\pm$ SD (SHAM)	< Moyenne + 1,5 x SD (SHAM)	< Moyenne + 2,0 x SD (SHAM)
	FC (bpm)	Moyenne $\pm$ SD (SHAM)	> Moyenne + 1,5 x SD (SHAM)	> Moyenne + 2,0 x SD (SHAM)
	Phényléphrine (μ g/CEC)	Moyenne - SD (CEC)	> Moyenne - SD (CEC)	
Coagulation	Plaquettes (K/ μ L)	> 300	< 300	<200
Cérébrale	Score comportement	Moyenne $\pm$ SD (SHAM)	> Moyenne + 1,5 x SD (SHAM)	> Moyenne + 2,0 x SD (SHAM)
Rénal	Créatinine (mg/dL)	< 1	< 13 & > 1	> 1,3
	Diurèse	Oui	Non	
Perfusion	Lactate (mM)	< 2	< 4 & > 2	>4

rpm : respiration par minute ; SD : *standard deviation* ; FC : Fréquence cardiaque ; bpm : battement par minute ; CEC : circulation extracorporelle ; Diurèse : présence d'urine dans la cage ou miction

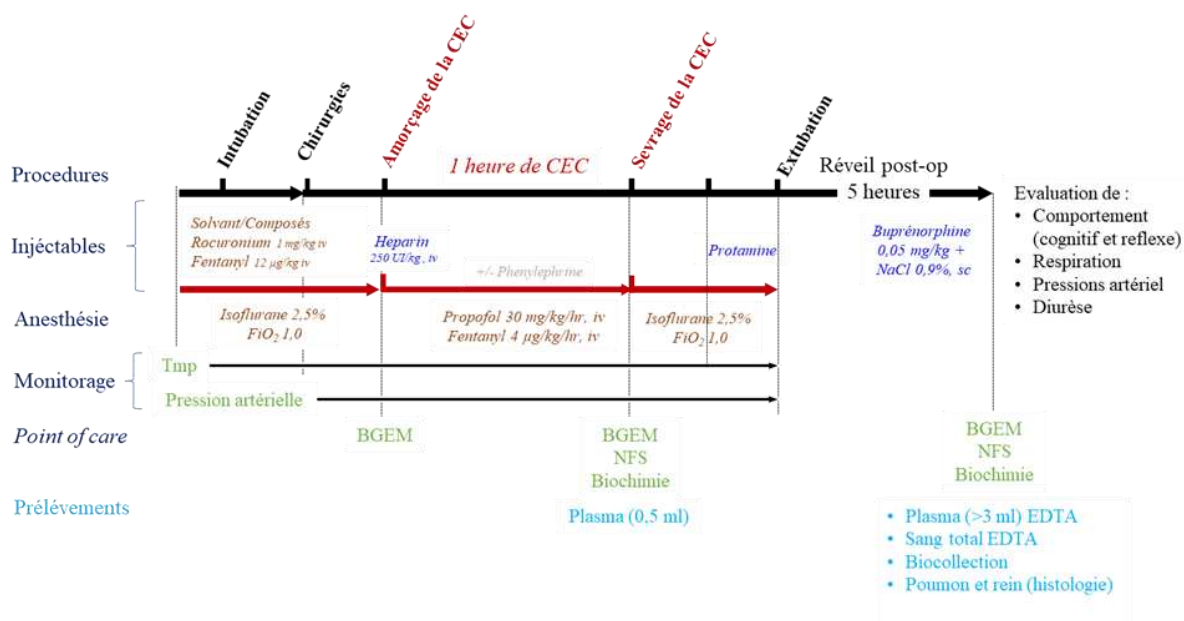


Figure 18 : Déroulé de la procédure et du protocole durant une journée de chirurgie

L'anesthésie à l'isoflurane a été utilisée pour l'induction dans un caisson à 5%, FiO₂ 1,0, pour le maintien avec un masque à 2,5% et avec une sonde orotrachéale (14G) grâce à une ventilation mécanique à 1,5%, FiO₂ 1,0 ; 6 mL/kg de volume courant, 58 ± 2 cycles/min pour le maintien de la normocapnie. Des bolus de fentanyl et de bromure de rocuronium ont été administrés avant l'intubation respectivement à 12 µg/kg et 1 mg/kg, iv. Pendant la CEC, l'anesthésie a été maintenue par la perfusion de Propofol/fentanyl à 30 mg/kg/h et 2 µg/kg/h respectivement. 250 UI/kg d'héparine non fractionnée ont été injectés par le cathéter carotidien avant l'initiation et ont été antagonisés à la fin du protocole grâce au sulfate de protamine. Les rats ont été extubés dès la reprise d'activité respiratoire spontanée. CEC : circulation extracorporelle ; BGEM : *Blood Gases Electrolytes Metabolites measure* ; FiO₂ : fraction inspirée d'oxygène.

2.4.2.5 Mesure sur les échantillons de sang

Analyses de *point of care* : du sang artériel a été prélevé avant et après la CEC et au moment du sacrifice pour mesurer : 1) la numération des cellules sanguines (NFS) sur un automate pour petits volumes sanguins (Hemavet 950FS®, Drew-scientific, Cumbria, UK), 2) les gaz sanguins/électrolytes/métabolites (BGEM) sur un lecteur de carte de point de soins (ePOC, carte BGEM ; Siemens Healthineers, France). Pendant la procédure, des échantillons de sang artériel ont été prélevés directement dans la ligne artérielle, à la fin de la chirurgie (début CEC) pour les mesures de BGEM, une heure plus tard (fin CEC) pour la NFS, la BGEM et le prélèvement de plasma et enfin 5 heures après l'opération (H+5) pour la NFS, la BGEM, le plasma et le prélèvement de sang total. Le lactate a également été mesuré sur des échantillons de sang veineux à l'aide du Nova StatStrip® Lactate Point-of-Care (Nova Biomedical, Rungis, France).

Analyse plasmatique : les différents paramètres ont été dosés sur un analyseur Cobas 6000 CeRoche (Roche Diagnostic, Meylan, France) avec des réactifs dédiés qui sont résumés dans le **Tableau 8**. Ces mesures sont effectuées au laboratoire de l'hôpital Laënnec, CHU-Nantes.

Tableau 8 : paramètres plasmatique mesurés et méthodes de dosages

Gènes cibles	Méthode de dosage	Réactifs
Créatinine		Créatinase
Urée	Enzymatiques avec mesure spectrophotométrique.	Uréase
Cholestérol		Cholestérol oxydase
HDL-cholestérol	Dosage des substrats	
Triglycérides		Lipase
Protéines totales		Réaction de Biuret
LDH	Enzymatiques avec mesure spectrophotométrique.	
Créatinine kinase		
Aspartates amino-transférase	Mesure activité enzymatique	
Alanine amino-transférase		
C-réactive protéine		
Troponine T	Méthodes Immuno-chimiques (utilisation d'un Ac) avec mesure par electrochimiluminescence	
IL-6		
Indice d'hémolyse	Mesures spectrophotométriques	
<i>HDL : high density lipoproteins ; LDH : lactate deshydrogénase ; IL-6 : interleukine 6</i>		

2.5 RT-qPCR

Extraction de l'ARN et rétrotranscription : L'extraction de l'ARN à partir de PBMC lysés a été effectuée conformément au manuel d'instructions du mini kit RNeasyPlus (Qiagen). Les ARN ont été récupérés dans 40 µL d'eau stérile sans RNase (Qiagen, France) et ont été dosés avec le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). A partir de 100 ng d'ARN, la rétro transcription a ensuite été réalisée avec le kit RT-superscript IV VILO (ThermoFischer) selon les recommandations du fabricant. Les ADNc ont été stockés à -80°C pour des expérimentations ultérieures.

Avant d'analyser les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêts, les couples d'amorces ont été validés grâce à une mesure d'efficacité en réalisant une courbe standard. Pour ce faire les réactions de qPCR sont effectuées à partir d'ADNc en concentrations croissantes (2,5 ng/µl à 0,56 pg/µl) pour pouvoir tracer la droite de régression exprimant les Cq en fonction du logarithme décimal des concentrations. Le coefficient directeur de cette droite et son coefficient de détermination R² détermine l'efficacité optimale des sondes. Une sonde est validée lorsque son efficacité est comprise entre 90% et 110%. La PCR quantitative ou qPCR est réalisée en dupliqua avec 5 µg d'ADNc par puits dilués dans un volume final de 20 µl avec un mélange réactionnel contenant du Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystem, Warrington, UK) et les couples d'amorces. Ces amorces se fixent spécifiquement au niveau d'une jonction exon-exon du gène d'intérêt dont on veut évaluer la quantité.

Pour toutes les PCR, les conditions thermiques sont les suivantes : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles comprenant chacun une dénaturation de 15 secondes à 95°C suivie d'une hybridation/élongation de 1 minute à 60 °C. Chaque échantillon doit être normalisé par rapport aux gènes de référence. Les qPCR ont été réalisées pour déterminer les cycles seuil (Cq) des gènes de références pour tous les échantillons Ensuite le calcul de la différence entre le Cq du gène d'intérêt (X) et le Cq des gènes de référence (Gapdh et Ywhaz) est réalisé pour chaque échantillon : $\Delta Cq (\text{échantillon}) = Cq (X) - Cq (\text{gènes de références})$. Les résultats sont exprimés par rapport au groupe contrôle par la formule suivante : $\Delta\Delta Cq (\text{échantillon}) = \Delta Cq (\text{échantillon}) - \text{Moyenne} (\Delta Cq (\text{échantillon contrôles}))$.

Ce résultat exprimé en valeurs logarithmiques est par la suite transposé en valeurs linéaires sous la forme $2^{-\Delta\Delta C_q}$.

Tableau 9 : Sondes utilisées en q-PCR

Gènes cibles	Séquence sens (5'→3')	Séquence anti sens (5'→3')	Efficacité
ATF4	TTAAGCCATGGCGCTCTTCAC	CCCATCCATAGCCAGCCATT	95 %
Ppp1r15a	GCCAGAGTACCCAGCATTGT	AGTGCACCTTTCTACCCTTCAG	92 %
Il-6	CTCTCCGCAAGAGACTTCCAG	TGTGGGTGGTATCCTCTGTGA	100 %
IL-1 β	TAGCAGCTTTTCGACAGTGAGG	CTCCACGGGCAAGACATAGG	96 %
Gapdh	ACTGGCGTCTTCACCACCATGG AGAAGGCT	CTCCTTGGAGGCCATGTAGGCC ATGAGGTC	95 %
Ywhaz	AGCGAGGGACATCTGCAAC	CTTTGCTTTCTGGCTGCGAA	97 %
IL-10	TGCGACGCTGTCATCGATTT	GTAGATGCCGGGTGGTTCAA	108 %
<i>ATF4 : Activated transcription factor ; Ppp1r15a : (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A; IL : Interleukin ; Gapdh : Glyceraldehyde phosphate déshydrogénase ; Ywhaz : Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i>			

2.6 Western blots

Pour étudier les variations d'expression des protéines impliquées dans la voie de l'ISR, des western blot sont réalisés sur des extraits protéiques des différents organes prélevés et provenant des animaux ayant subi une CEC : lors de la mise au point (CEC de 30 minutes) ou lors des tests de molécules (CEC de 1 heures suivie de 5 heures de réveils).

Tableau 10 : Compositions des tampons RIPA et de lyse pour extraction des protéines

Composition du tampon de RIPA		
molécules	Concentration initiale	Pour 100 mL
NaCl	150 mM	0,877 g
Sodium deoxycholate	0,5 %	0,5 g
Nodinet P 40	1 %	1 mL
SDS	0,1 %	500 µl
Tris-HCl	50 mM pH 8	0,444 g
Tris-Base		0,265 g
H ₂ O		Qsp 100 mL
Composition du tampon de lyse		
	Concentration initiale	Volume (µL) pour 1 mL
NButGT	20 mM	2
PMSF	100 X	10
Nodinet P 40		2,5
Complexe d'inhibiteurs de protéases	100 X	10
EDTA (ph 8.0)	0,5 mM	40
Phospho STOP (Roche)	10X	100
RIPA		Qsp 1000
<i>RIPA : Radioimmunoprecipitation ; Tris : trisaminométhane ; NButGT : 1,2-dideoxy-2'-propyl-α-D-glucopyranoso-[2,1-d]-Δ2'-thiazoline ; PMSF : fluorure de phénylméthanesulfonyl ; EDTA : Éthylènediaminetétraacétique</i>		

L'extraction protéique est réalisée à partir d'une poudre grossière obtenus par broyage au mortier/pilon des organes maintenus congelés dans l'azote liquide et par un broyage au TissueLyser®, dans un tampon de lyse préparé à partir de tampon RIPA (*Radioimmunoprecipitation buffer*, **Tableau 10**).

Après un broyage à 30 Hz pendant 1 min 30 au TissueLyser®, les échantillons sont centrifugés à 20 000 g pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés et un dosage

protéique est réalisé grâce au réactif BCA (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Etats-Unis) par lecture en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 560 nm. Les échantillons protéiques (25 µg/10 µl) sont dénaturés 5 minutes à 95°C en présence de 2 µl de tampon Laemmli (Dodécylsulfate de sodium (SDS) 10%, glycérol 50%, dithiothreitol (DTT) à 50 mM, Tris pH 6, à 325 mM, bleu de charge). Puis les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse pré-coulé BioRad 4-15% en polyacrylamide/SDS et la migration se fait à voltage constant de 90 V. A la fin de la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (Polyfulorure de vinylidène) par la technologie « transfert turbo » de transfert semi sec Bio-Rad (7 min à 2,5 A, 25 V). Pour vérifier la qualité du transfert, un marquage Stain-Free est réalisé. Lors de la formation des gels pré-coulés BioRad des composants trihalo sont ajoutés, ils vont former des réactions covalentes avec les résidus tryptophanes des protéines qui ont migrées sur le gel. Une exposition aux UV des gels et des membranes transférées permet l'activation des réactions covalentes et entraîne une fluorescence. Cette étape permet de vérifier la qualité de séparation des protéines après la migration, de valider l'efficacité du transfert ou de quantifier les protéines afin de normaliser les échantillons. Les interactions protéines-protéines non spécifiques sont bloquées sur les membranes par une solution de lait 5% diluée dans du TBS (Trizma base 200 mM ; NaCl 1,4 M ; pH = 7,5 ; SigmaAldrich) contenant 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich ; TBS-1X -0,1% Tween) pendant 2h à température ambiante. Par la suite, l'anticorps primaire est incubé sous agitation douce toute la nuit à 4 C dans une solution de lait 5% dilué dans du TBS-1X -0,1% Tween. Après lavages au TBS-1X -0,1% Tween, la membrane est incubée pendant 1 heure et 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase en solution dans du lait 1% dilué dans du TBS-1X -0,1% Tween. Les différentes caractéristiques des anticorps primaires et secondaires sont présentées dans le **Tableau 9**. La révélation des blots est réalisée avec un processus de détection de chimiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad, Hercules, USA). Le signal est enregistré grâce à une caméra (Chemidoc Imager, Bio-Rad) et l'intensité des bandes est évaluée par densitométrie grâce au logiciel d'analyse Image Lab (Bio Rad). La quantification de l'intensité de ces bandes est rapportée à la moyenne de l'intensité du marquage aspécifique du *stain free* pour chaque puit.

Tableau 11 : Anticorps primaires et secondaires utilisés

Anticorps primaires utilisés			
Cibles	Origine	Réactivité	Taille attendue (kDa)
GADD34	ProteinTech 10-49-1-AP	Rabbit	100
CHOP	Cell Signaling #2895	Mouse	27
p-Ser ⁵¹ -eIF2- α	Cell Signaling #9721	Rabbit	38
eIF2- α total	Cell Signaling #9722	Rabbit	38
Anticorps secondaires utilisés			
Cibles	Origine	Dilution	Réactivité
Anti-Rabbit	Cell Signaling #	1/20 000	IgG rabbit
Anti-Mouse	Cell Signaling #	1/20 000	IgM Mouse

GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein ; CHOP : C/EBP Homologous Protein ; eIF2- α : eukaryotic Initiation Factor 2

2.7 ELISA immuno assays

La mesure des cytokines (pro inflammatoires IL-6 et IL-1 β et anti inflammatoire IL-10) présentes autant dans le surnageant issus de la culture cellulaire que du plasma de rats opérés est effectuée par l'utilisation de kit ELISA selon les recommandations du fournisseur (R&D systems). Brièvement, les puits d'une plaque 96 puits seront *coatés* par l'anticorps de capture pendant une nuit. Chaque étape sera séparée de 3 lavages successifs. Le réactif « *reagent diluent* » est introduit et incubé 1 heure. Les échantillons dilués selon les recommandations sont chargés dans les puits en dupliquas et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Enfin l'anticorps de détections de la cytokine d'intérêt est incubé pendant 2 heures. La détection sera possible à la suite de l'introduction et incubation de streptavidine liée à une *horse radish peroxydase* (HRP). La réaction sera arrêtée avec une solution stop et la lecture de la densité optique sera faite à 450 nm et 540 ou 570 nm.

L'analyse se fait par la détermination d'une courbe étalon basée sur l'absorbance mesurée des échantillons de la gamme fournie par le constructeur. L'extrapolation des

concentrations en fonction de l'absorbance a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism 8.0. Enfin, les valeurs ont été corrigé par le facteur de dilution établi au début du protocole.

Les concentrations mesurées de cytokines effectuées sur le plasma des animaux ayant subi une chirurgie ont été normalisée par la quantité de protéine totale plasmatique mesurée dans la section 2.4.2.5. Cette méthode permet de s'affranchir de de la dilution de tissu sanguin qui a lieu lors de cette chirurgie mais qui n'est pas la même entre les groupes et les animaux.

2.8 Histologie pulmonaire

Au cours de la CEC l'atteinte pulmonaire possible peut difficilement être vérifiée par la présence de biomarqueurs circulants mais définie par une atteinte histologique. Parmi le différents marqueurs que l'on pourrait évaluer, nous pouvons regarder la déstructuration des alvéoles mais également l'infiltrat de cellules inflammatoire comme les neutrophiles, où l'état d'oxydation des protéines para marquage des protéines modifiées : la nitro tyrosine.

L'évaluation histologique a été faite dans cette étude sur le lobe pulmonaire droit ainsi que le rein droit. Les études effectuées ont porté sur :

- La morphologie tissulaire des organes observés au microscope après coloration
- L'état de stress oxydatifs dans les organes par un marquage des protéines modifiées par un stress oxydatif
- L'infiltration de cellules dans les tissus

Les poumons fixés ont été inclus dans de la paraffine, sectionnés à 7 µm et colorés avec la coloration a naphtol a permis la visualisation des structures et des neutrophiles.

L'état d'oxydation des protéines potentiellement liée à des lésions ischémiques et de reperfusion, une altération de l'utilisation de l'O₂ ou du métabolisme est évalué par l'utilisation d'anticorps anti nitrotyrosine (Merck 06-284 lot 2278511) et de marquage des noyaux (DAPI). Brièvement le protocole utilisé était le suivant :

Les coupes de tissus ont été déparaffiner (*tissue clear*, Sakura 1466, et éthanol à 100-95-80-70°, 3 fois 5 minutes) puis immergées dans un Tampon Citrate 10 mM à ébullition pendant 40 minutes puis 30 minutes dans du Triton 0,3 %. Une incubation dans du sérum (30 minutes, *normal goat serum* 10%) précède une incubation de 15 minutes dans du Noir Soudan 0,5 % puis dans l'anticorps anti-nitrotyrosine dilué au 200^{ème} sur la nuit. Après 3 lavages au PBS de 5 minutes chacun les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (anti-rabbit, dilué au 400^{ème} à température ambiante, Merck 06-284 lot 2278511) et relavés au PBS. Enfin le montage fluoromount (Southern Biotech 0100-20) + DAPI est effectué. Les lames sont évaluées à 200X (Nikon eclipse 600 avec Nikon DS-Ri1)

2.9 Étude sur la cohorte IBIS Témoin

2.9.1 Éthique et déclaration

De décembre 2019 à mars 2021, 41 patients subissant une chirurgie avec CEC au CHU de Nantes ont été inclus dans cette étude. Tous les patients ont bénéficié d'une anesthésie générale et d'une prise en charge postopératoire selon la pratique clinique. Cette étude prospective a été réalisée au CHU de Nantes en chirurgie cardiaque et en unité de soins intensifs. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la recherche de l'hôpital de Nantes (Groupe Nantais d'Ethique dans le Domaine de la Santé, Nantes, France). Les consentements ont été recueillis la veille de la chirurgie.

2.9.2 Inclusion

Les patients adultes (âgés de plus de 18 ans) bénéficiant d'une chirurgie cardiaque sous CEC le matin ont été inclus. La chirurgie devait concerner au moins une valve ou au moins l'aorte ascendante (pour les procédures de Bentall ou Tirone David, par exemple) et le CEC devait durer au moins 60 minutes. Les échantillons de sang devaient être traités dans les deux heures post-prélèvement pour être inclus (**Figure 19**).

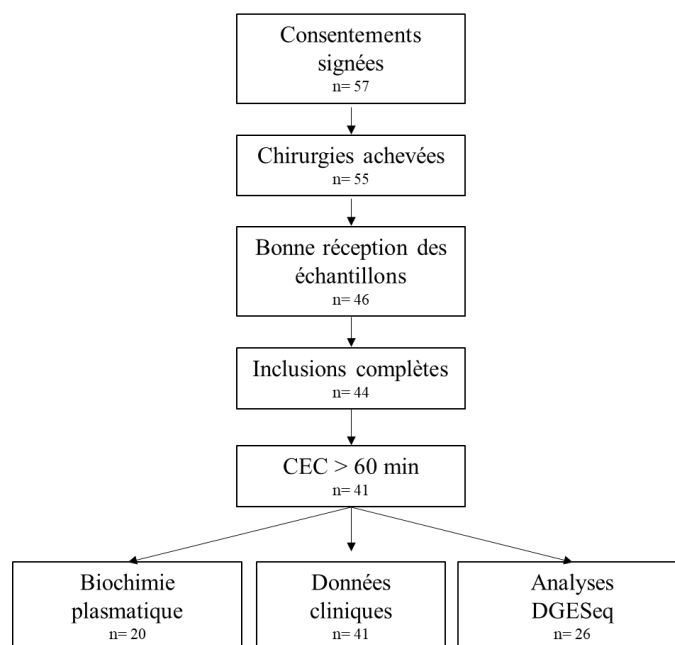


Figure 19 : Diagramme des inclusions de la cohorte

CEC : circulation extracorporelle ; DGESeq : *Differential gene expression Sequencing*

2.9.3 Données cliniques, prélèvement et traitement du sang

Toutes les données cliniques, les résultats biochimiques et les événements ont été enregistrés et rapportés de manière prospective. Des échantillons de sang total de 16 ml ont été prélevés sur EDTA à trois moments différents, respectivement : au moment de l'induction de l'anesthésie, au moment du déclampage aortique (fin de la CEC), et 5 heures après le déclampage. Les échantillons de sang ont été immédiatement apportés au laboratoire pour être traités. Un ml de sang total a d'abord été prélevé et 15 ml ont ensuite été centrifugés (1 700g, 10 min, 20°C), le plasma a été aliquoté. Le culot de sang a été remis en suspension dans du D-PBS stérile (Gibco, ThermoFischer, France) jusqu'à 30 ml et a été doucement homogénéisé et soigneusement placé sur une couche de 20 ml de Ficoll stérile dans un tube Falco stérile de 50 ml et centrifugé pendant 35 min à 400 g, 20°C). La couche de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) a ensuite été recueillie et lavée dans 50 ml de DPBS stérile. Enfin, les cellules ont été recueillies et mises en suspension dans 500 à 700µL de solution RLTplus pour l'extraction de l'ARN. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C.

2.9.4 Analyse statistique et traitement des données cliniques

Les données démographiques ont été traitées et l'analyse statistique de l'évolution des marqueurs biologiques dans le temps a été réalisée grâce aux packages R "arsenal" et "questionr". L'analyse de Kruskal-Wallis a été effectuée pour les comparaisons entre les heures supplémentaires avec les tests pot hoc de Dunn.

2.9.5 Extraction de l'ARN du sang total

Extraction de l'ARN et rétrotranscription : L'extraction de l'ARN à partir de PBMC lysés a été effectuée conformément au manuel d'instructions du mini kit RNeasyPlus. Les ARN ont été récupérés dans 40 µL d'eau stérile sans ARNse (Qiagen, France) et ont été dosés avec le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). A partir de 100 ng d'ARN, la rétro transcription a ensuite été réalisée avec le kit RT-superscript IV VILO selon les recommandations du fabricant. Les ADNc ont été stockés à -80°C pour des expérimentations ultérieures.

2.10 Analyse transcriptomique

2.10.1 Préparation et méthode DGESeq et analyses secondaires

Après les étapes de retrotranscription et vérification de la qualité et de la quantité des échantillons, la préparation des échantillons et la transcriptomique jusqu'à l'analyse primaire a été effectuée par la plateforme GenoBird. L'intégralité du protocole est expliqué et détaillé dans une publication récente (Charpentier et al., 2021). Brièvement, l'approche 3'seq-RNA Profiling (3'SRP) de transcriptomique est basée sur le multiplexage d'échantillons et l'indexation moléculaire de l'ARNm afin d'établir un profil transcriptionnel à l'échelle du génome à un coût raisonnable par rapport au séquençage standard de l'ARN. Le protocole est réalisé selon l'approche *3'-differential gene expression* (3'-DGE) développée par le Broad Institute. Les bibliothèques sont préparées à partir de petites quantités d'ARN total où les queues poly(A) des ARNm sont marquées avec des adaptateurs universels, des codes-barres bien spécifiques et des identificateurs moléculaires uniques (UMI). L'étape de fragmentation est effectuée grâce à un marquage basé sur l'activité d'un transposome lié à des billes. Cela permet le multiplexage des échantillons sur des plaques à 96 puits. Les bibliothèques sont ensuite séquencées selon des procédures standard sur NovaSeq 6000 SP. L'analyse est effectuée par un pipeline *snakemake* comprenant chaque étape d'analyse, du démultiplexage fastq brut à l'annotation fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés.

L'analyse secondaire peut être effectuée par la filtration des données brutes issues de l'analyse primaire (Charpentier et al., 2021). Les filtres de sélection étaient :

- Gènes détectés > 5000
- UMI > 200 000

Une étape de normalisation a été effectuée suivant la méthode DESeq2. L'analyse secondaire du DGESeq chez l'Homme et le rat a été effectuée avec le logiciel R avec les packages suivant :

- "questionR" et "arsenal" : pour le tri des données et le recodage des variables
- "timecourse" : Pour l'analyse chez l'Homme uniquement : a permis la sélection de gènes différentiellement exprimés par une méthode de *ranking* avec un *Hotteling T²*

Score. Cette méthode permet la comparaison de données appariées dans le temps, ce qui n'est pas possible sur le pipeline d'analyse de la plateforme GenoBird. Les top 8 % des gènes les plus différentiellement exprimés chez le plus grand nombre de patients sont considérés différentiellement exprimés.

- "clusteRprofiler" : Pour les analyses d'enrichissement d'annotations et les représentation graphiques associées. Les enrichissements de *Gene Ontology (GO)*, *Biological Process* et de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) permettant de mettre en évidence les annotations de processus biologiques et des voies de signalisations les plus statistiquement représentés parmi les gènes sélectionnés

Les analyses d'enrichissement GO et KEGG ont été effectuées à l'aide de la base de données pour l'annotation exploitées par la package clusteRprofiler. Les identifiants de gènes SYMBOL ont été utilisés ou si besoin convertis avec les GeneID pour les analyses. Ensuite, les termes GO et KEGG statistiquement plus représenté (avec valeur de pvalue corrigée de Benjamini Hochberg $< 0,05$) ont été représenté par un graphique *dotplot* permettant de rendre compte de la significativité et du compte de gènes regroupés pour une annotation.

2.10.1 Plan expérimental et groupes

L'étude est composée de plusieurs parties utilisant des cellules, des animaux mais également des échantillons provenant de patients humains issu de chirurgie cardiaque. Les différents groupes formés peuvent-être séparés en fonction des différentes expérimentations. Les tests effectués, les effectifs et les groupes sont résumé dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Composition des groupes, des expériences et des effectifs par étude

Espèce	Etude	Groupes	CPB	Réveil	Expériences	Effectifs	
Sélection des composés <i>in vitro</i>							
Rat Wistar male	Tests des composés	Contrôles	Monocytes seuls + DMSO				
		LPS	Cellules exposées au LPS + DMSO	Non	Non	ELISA/PCR	3 à 6 / groupe/concentration
		Traités	Cellules + LPS + composés IFB (0,5/1/5/10 µM) + DMSO.				
Modèle de CEC							
Rat Wistar male	mise au point	Sham	= CPB sans mise en route de la pompe	Non	Non	Western blot	3/groupes
		CEC 30min	CPB 30 min	Oui			
Rat Wistar male	Tests des composés Vigiles	Ctrl	Injectés avec le solvant	Non	Non	Monitoring hémodynamique	3/groupes
		Traités	Injectés avec les composés IFB à évaluer				
	Tests des composés	Sham	= CPB sans mise en route de la pompe	Non	Oui	Monitoring hémodynamique, BGEM, biochimie, western blot, ELISA, histologie	8 rats inclus
		CPB	CPB	Oui			8 rats inclus
		CPB + composés	CPB + traitement avec les composés	Oui			4 à 8 rats /groupe
Transcriptomique							
Rat Wistar male	Transcriptomique	Sham	= CPB sans mise en route de la pompe	Non	Non	Monitoring hémodynamique/ données pré/per/post	6-7/ groupes
		CPB	CPB 60 min	Oui			

2.11 Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés comme la moyenne $\pm$ SEM (erreur standards moyenne) de n effectifs. La normalité des groupes a été testés avec un test de Shapiro Wilk. La comparaison des temps et des groupes a été effectuée à l'aide d'une ANOVA à deux voies appariées et du test de comparaisons multiples de Sidak. Pour la comparaison d'un groupe dans le temps, l'analyse a été effectuée à l'aide d'un test de ANOVA une voie si la normalité est vérifiée au sein des échantillons ou un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et a ensuite été analysée à l'aide d'un test post-hoc de Dunn (GraphPad Prism 7). Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Pour les données cliniques et l'analyse secondaire DEGseq chez l'Homme et le rat, les logiciels "questionR", "arsenal", "timecourse" et "clusteRprofiler" ont été utilisés avec le logiciel R et studio version.

3 Résultats

L'objectif principal de cette thèse est l'évaluation de l'effet d'une modulation de l'ISR dans un modèle animal de CEC présentant un SRIS et des dysfonctions d'un ou plusieurs organes. Pour cela, il a fallu dans un premier temps mettre au point un modèle de CEC qui se rapproche le plus de ce qui se passe chez l'Homme et reproduisant un phénotype potentiellement délétère. Durant la phase de mise au point du modèle, l'état d'activation de l'ISR dans plusieurs organes a été confirmé. Afin de valider la pertinence du modèle par rapport à la clinique, des patients ayant subi une CEC ont été inclus et ont servi de point de comparaison. La comparaison a été basée sur la similitude entre les mesures des paramètres biochimiques plasmatiques et des processus biologiques les plus impactés lors de la CEC, évalués par une analyse transcriptomique.

Enfin différentes molécules développées par InFlectis BioScience ont été testées sur le modèle afin de pouvoir évaluer l'effet de la modulation de l'ISR dans l'apparition des conséquences du SRIS durant et suivant une CEC.

3.1 Mise au point du modèle sur 30 minutes de CEC et évaluation de l'activation de l'ISR après CEC

3.1.1 Hémodynamique et hémocrite

Dans cette phase de mise au point, la première étape a été de s'assurer que la procédure de CEC est suffisante pour maintenir une pression artérielle supérieure à 60mmHg durant la chirurgie. Pour cela, la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque ainsi que l'hémocrite ont été contrôlées pendant la chirurgie (ou la CEC) (**Figure 20**).

Pendant la chirurgie (Chirurgie) aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes Sham et CEC que ce soit sur la mesure de la pression artérielle moyenne ou de la fréquence cardiaque. En revanche, à l'amorçage de la CEC, les groupes CEC présentent une pression artérielle moyenne significativement plus basse que celle des Sham, groupe contrôle d'animaux qui ne subissent pas de CEC (Sham : $88,00 \pm 0,70$ mmHg ; CEC : $62,70 \pm 2,60$ mmHg, $p < 0,05$). Cette différence est maintenue après 30 minutes de CEC (Sham : $89,00 \pm 3,21$ mmHg ; CEC : $73,67 \pm 1,86$ mmHg, $p < 0,05$). De la même manière, la fréquence cardiaque chez les animaux subissant la CEC est diminuée en comparaison à celle des Sham dès l'amorçage de la CEC (Sham : 397 ± 9 bpm ; CEC : 316 ± 23 bpm, $p < 0,05$) et du sevrage après 30 min de CEC (Sham : 393 ± 11 bpm ; CEC : 331 ± 12 bpm, $p < 0,05$). L'hémodilution inhérente au protocole résulte en une différence significative de l'hémocrite chez les rats CEC (Chirurgie : $39,67 \pm 0,33$ % ; amorçage de CEC : $26,33 \pm 1,20$; 30 min de CEC : $25,00 \pm 1,12$ %, $p < 0,05$) sans modifications chez les Sham.

Ces résultats indiquent que la CEC a permis durant 30 minutes le maintien des pressions artérielles moyennes, au-dessus de 60mmHg, et que l'hémodilution, même si importante, a été limitée.

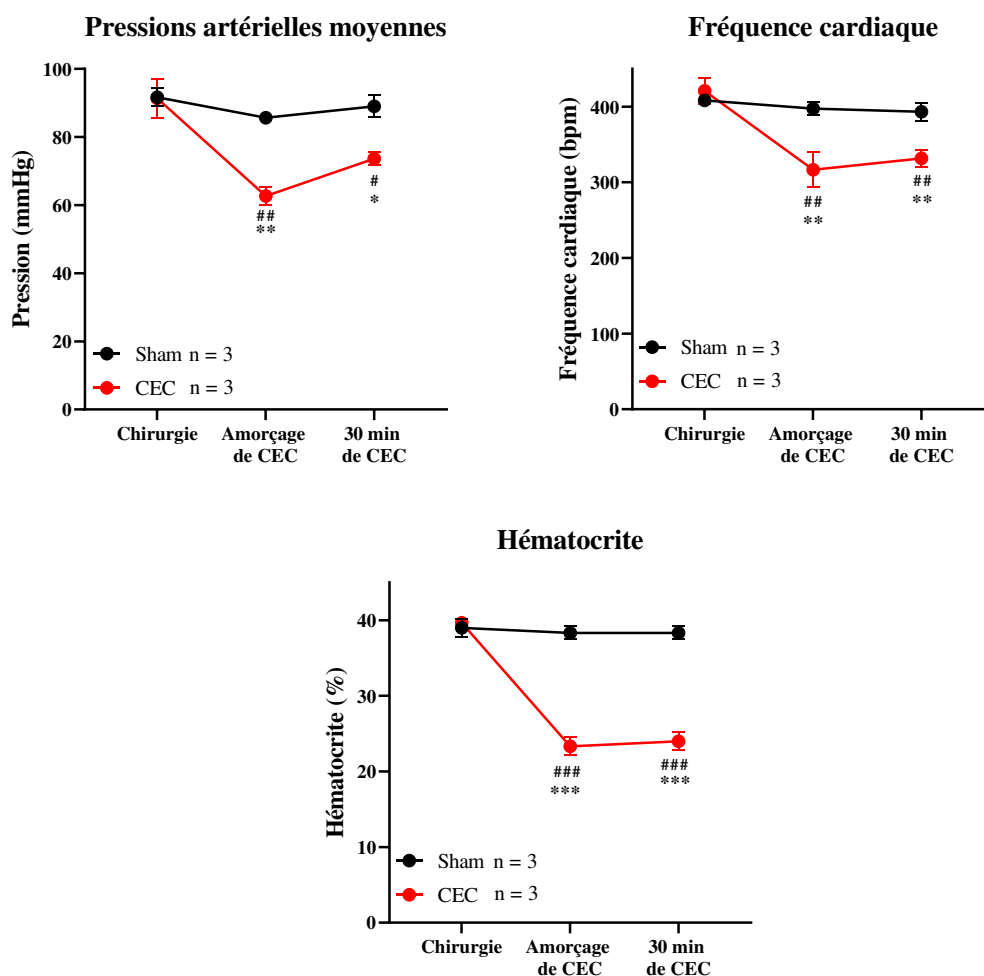


Figure 20 : Surveillance hémodynamique et mesure de l'hémoglobininémie chez le rat au cours du temps.

Le groupe Sham (n=3) est représenté en noir et le groupe CEC (n=3) en rouge. La pression artérielle moyenne (mmHg), la fréquence cardiaque (battements par minutes) et l'hématocrite (%) sont mesurés au cours de la chirurgie, de l'amorçage de la CEC jusqu'au sevrage de CEC à 30 min. Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ SEM. La significativité est évaluée par un test apparié ANOVA deux voies avec test *post hoc* de Bonferroni. *** : $p < 0,001$ vs Sham ; ** : $p < 0,01$ vs Sham ; * : $p < 0,05$ vs Sham ; *** : $p < 0,001$ vs Sham ; # : $p < 0,05$ vs Chirurgie ; ## : $p < 0,01$ vs Chirurgie ; ### : $p < 0,001$ vs Chirurgie

3.1.2 Western blot des acteurs de l'ISR

A la suite du sevrage de la CEC, les reins, cœurs, foie, poumon et cerveau ont été prélevés et les protéines extraites ont servi à évaluer l'état de l'activation de l'ISR. Les expressions de protéines GADD34, CHOP, eIF2 α et de sa forme phosphorylée (P-Ser⁵¹-eIF2 α) ont donc été évalués dans les différents organes par western blot (**Figure 21**).

Nous avons choisi de ne représenter ici que les résultats obtenus à partir des poumons de rats Sham ou CEC, qui présentaient les différences les plus importantes. Si les effectifs n'étaient pas assez importants au cours de ces expériences pour montrer une différence significative, des tendances fortes en faveur de l'activation de la voie de l'ISR sont mises en évidence. En effet l'expression pulmonaire de eIF2 α chez les rats ayant subi une CEC est diminuée de moitié (Sham : $1,00 \pm 0,21$; CEC : $0,47 \pm 0,12$) et celle de sa forme phosphorylée est augmentée d'un facteur 4 (Sham : $1,00 \pm 0,07$; CEC : $4,04 \pm 0,32$). Le ratio de la forme phosphorylée de eIF2 α sur sa forme totale est augmenté d'un facteur 10 chez les CEC comparés aux Sham. L'expression protéiques en aval de eIF2 α se voit ainsi également augmentées : comme CHOP par un facteur 2 (Sham : $1,00 \pm 0,19$; CEC : $2,00 \pm 0,15$) et GADD34 par un facteur 5 (Sham : $1,00 \pm 0,13$; CEC : $5,2 \pm 0,82$).

Ces résultats suggèrent une activation de la voie de l'ISR dépendante de la CEC dans le tissu pulmonaire. Cela conforte l'intérêt de moduler l'ISR lors de la CEC et particulièrement dans les CEC plus longues.

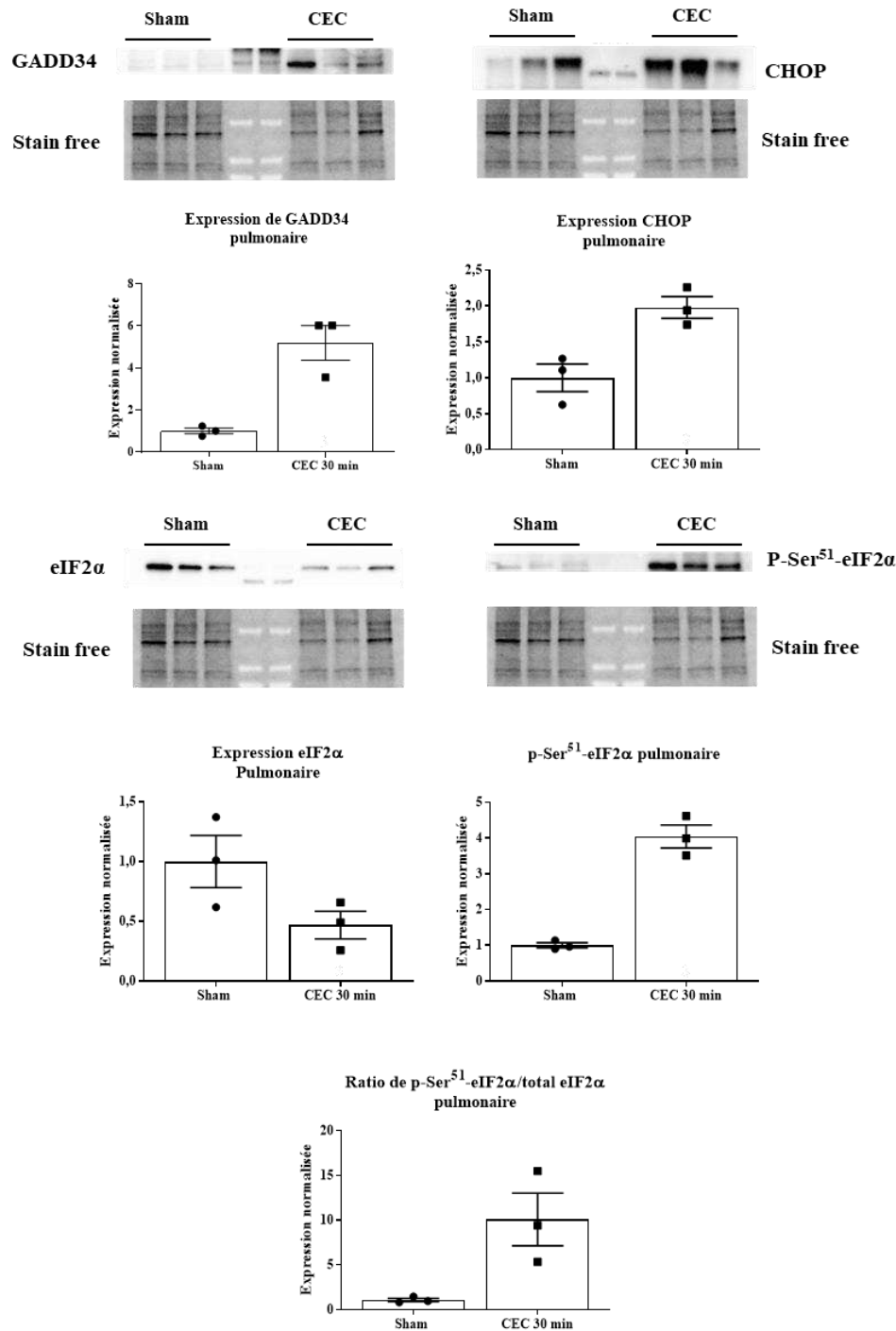


Figure 21 : Evaluation de l'expression de protéines pulmonaires impliquées dans l'ISR après 30 min de CEC

L'expression des protéines extraites GADD34, CHOP, eIF2α et sa forme phosphorylée p-Ser⁵¹-eIF2α est évaluée par western blot sur des extractions protéiques issues des poumons des rats. L'intensité des bandes sont rapportées à la moyenne de l'intensité des bandes du stain free. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM des Sham (n=3) et des CEC (n=3). GADD34 : *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein* ; CHOP : *C/EBP homologous protein* ; eIF : *eucaryotic initiation factor*

3.2 Caractérisation du modèle et comparaison avec la clinique

3.2.1 Etude chez l'Homme

3.2.1.1 Démographie

Quarante et un patients ont été inclus, le sexe ratio est de 1 femme pour 4 Hommes (87.8% d'Homme) et l'âge moyen de 66,1 ans (**Tableau 13**). Ils ont principalement subi une chirurgie cardiaque avec le remplacement d'une ou deux valves, 9 patients ont subi une chirurgie plus complexe telle qu'une chirurgie de l'aorte ascendante ou une chirurgie complexe plus longues (plus de 3 procédures concomitantes). Chaque patient présentait au moins une comorbidité ou un antécédent clinique pathologique. Tous les patients ont reçu un inotrope ou un vasopresseur pendant et après la chirurgie. Pendant l'opération, 6 patients ont eu besoin d'une transfusion et 4 ont eu besoin d'une transfusion lors de leur passage en soins intensifs. La durée moyenne de CEC était de 126,9 minutes, la durée moyenne de la ventilation des patients était de 13 heures et un seul patient a développé une infection pulmonaire.

Tableau 13 : Données de démographie issue des données cliniques

Paramètres	(N=41)
Sexe (Homme)	36 (87.8%)
Age (Années)	
Moyenne (SD)	66.1 (12.9)
Range	32.0 - 82.0
Indice de masse corporelle	
Moyenne (SD)	26.0 (3.6)
Range	20.0 - 38.0
Types de Chirurgies	
Valves mitrale et tricuspide	10 (24.4%)
PAC	7 (17.1%)
Aorte	6 (14.6%)
Valve mitrale	5 (12.2%)
PAC + Valve aortique	4 (9.7%)
Valve aortique + tricuspide	2 (4.9%)
Valve aortique	2 (4.9%)
Aorte + PAC	1 (2.4%)

Aorte + Valve aortique	1 (2.4%)
Valves aortique et tricuspide	1 (2.4%)
PAC + Valve mitrale	1 (2.4%)
>3 procédures	1 (2.4%)
Redux	2 (4.9%)
Dyslipidémie	25 (61.0%)
Hypertension	28 (68.3%)
Tabagisme	
Non-Fumeur	37 (90.2%)
Fumeur	4 (9.8%)
Diabétique	7 (17.1%)
Obésité	5 (12.2%)
Antécédents familiaux	3 (7.3%)
Exogénose	3 (7.3%)
NYHA	
0	4 (9.8%)
I	8 (19.5%)
II	24 (58.5%)
III	5 (12.2%)
Artériopathie	8 (19.5%)
Infarctus du myocarde	11 (26.8%)
Dysfonction cérébrale	1 (2.4%)
Insuffisance rénale chronique	9 (22.0%)
Dialyse	1 (2.4%)
Bronchopathie obstructive	2 (4.9%)
Asthme	1 (2.4%)
Fraction d'éjection ventriculaire gauche	
Moyenne (SD)	60.8 (7.8)
Range	40.0 - 70.0
EUROSCORE II	
Moyenne (SD)	2.5 (2.2)
Range	0.8 - 11.6
Durée de CEC (min)	
Moyenne (SD)	126.9 (37.5)
Range	63.0 - 229.0
Durée de clampage aortique (min)	
Moyenne (SD)	98.0 (30.2)
Range	45.0 - 182.0

Catécholamine	39 (95.1%)
Norépinephrine	37 (90.2%)
Dobutamine	20 (48.8%)
Milrinone	41 (100.0%)
Transfusion per-op	6 (14.6%)
Utilisation de Cell Saver	41 (100.0%)
VIS Score 6Hr post-opératoire	
Moyenne (SD)	7.6 (18.1)
Range	0.0 - 112.0
Score KDIGO 24Hr post-opératoire	
0	31 (75.6%)
1	7 (17.1%)
2	2 (4.9%)
3	1 (2.4%)
Dysfonction ventriculaire post-opératoire	17 (41.5%)
Hydroxycortisone	2 (4.9%)
Durée de ventilation	
Moyenne (SD)	13.0 (48.1)
Range	2.0 - 312.0
Infections pulmonaire	1 (2.4%)
Volume de saignement post-opératoire (mL)	
Moyenne (SD)	191.8 (116.5)
Range	70.0 - 500.0
Transfusions en soins intensifs	4 (9.8%)
Durée en soin intensifs (Jours)	
Moyenne (SD)	3.8 (5.9)
Range	1.0 - 34.0
Durée d'hospitalisation (Jours)	
Moyenne (SD)	13.6 (6.1)
Range	6.0 - 34.0
<i>NYHA: New York Heart Association classification; EUROSCORE: European System for Cardiac Operative Risk Evaluation; Score VIS: Vasoactive-Inotropic Score, KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes ; SD : Standard deviation</i>	

3.2.1.2 Biochimie et biomarqueurs plasmatiques

Pour chaque patient un prélèvement de sang a été effectué à l'induction de l'anesthésie, au déclantage aortique et à 5h en postopératoire en service de réanimation. Pour chaque prélèvement le plasma a été isolé et a servi à la mesure de paramètres biochimiques. L'objectif est ici d'évaluer quels paramètres sont les plus impactés par la circulation extracorporelle. Ces valeurs serviront de référence pour la comparaison avec le modèle de rat développé.

La mesure des marqueurs rénaux plasmatique, la créatinine et l'urée, ont permis la mise en évidence de l'augmentation significative de la créatinine de l'amorçage à 5 heures postopératoires (Induction : $83,97 \pm 5,39$; 5 Heures Post-Op : $105,86 \pm 6,58$ mmol/L ; $p < 0,001$, **Figure 22**) sans modification des concentrations plasmatiques d'urée. Le stress tissulaire a été évalué par la mesure de marqueurs non spécifiques du stress tissulaire : la lactate déshydrogénase (LDH) et la créatinine kinase (CK). Les valeurs de la LDH augmentent au fil du temps (Induction : 245 ± 65 ; déclantage aortique : 316 ± 32 ; H+5 : 541 ± 64 U/L) significativement au moment du déclantage aortique ($p < 0,01$) et 5 heures après le déclantage ($p < 0,001$) par rapport au moment de l'induction. En outre, les patients ont présenté une augmentation persistante de la CK au fil du temps (Induction : $95,23 \pm 12,22$; déclantage aortique : $271,9 \pm 41,1$; H+5 : $1024 \pm 386,5$ U/L) qui était significative au moment du déclantage aortique ($p < 0,05$) et 5 heures après le déclantage ($p < 0,01$) par rapport au moment de l'induction mais aussi entre le déclantage et 5 heures plus tard ($p < 0,0001$).

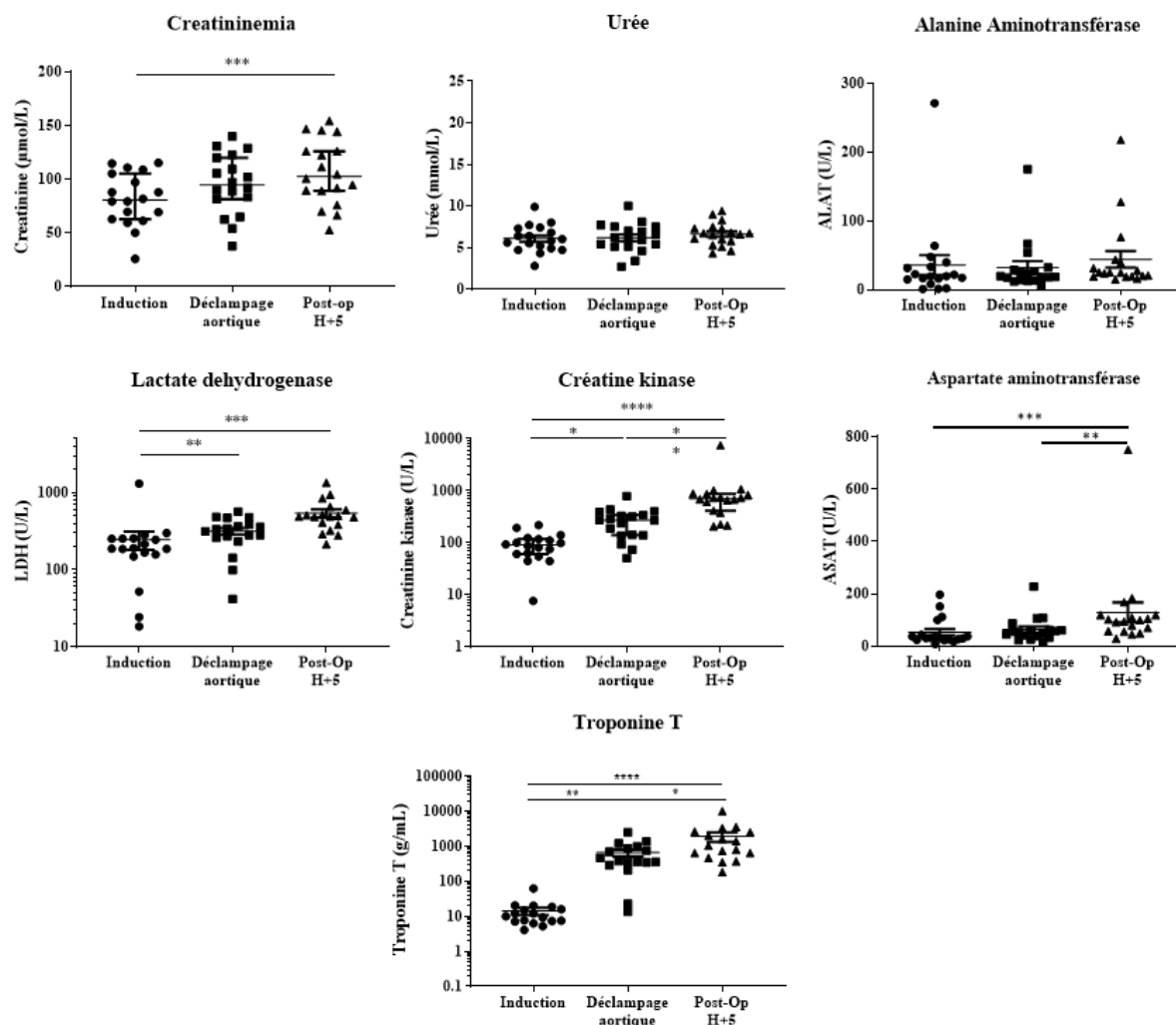


Figure 22 : Mesure de marqueurs plasmatiques rénaux et de stress à partir de sang artériel des patients

Mesure plasmatique des marqueurs rénaux (Créatine et Urée), cardiaque (Troponine T) et des marqueurs de stress ASAT, ALAT, LDH et créatine kinase à partir de plasma de patients ayant bénéficiés d'une chirurgie cardiaque. Du plasma a été prélevé à l'induction de l'anesthésie, lors du déclantage aortique et 5 heures après l'opération (H+5). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests appariés d'ANOVA une voie avec le test post-hoc de Dunn. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$.

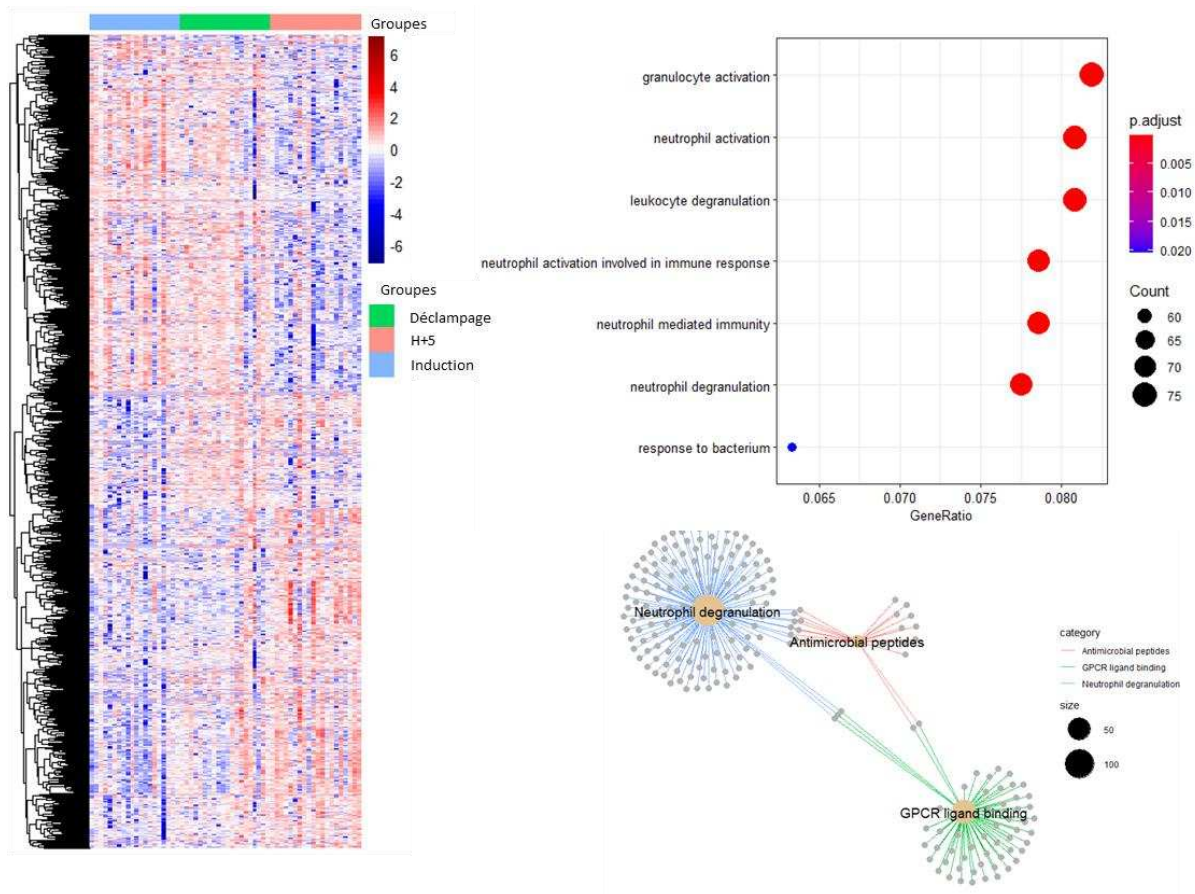
3.2.1.3 Analyse DGESeq chez le patient

Afin d'affiner la comparaison avec le modèle de CEC, une analyse transcriptomique a été réalisée par DGEseq sur les PBMC isolés de sang de patients collectés à l'induction de la CEC, au moment du déclampage et 5 heures après le déclampage.

L'analyse de l'évolution des niveaux d'expression de chaque gène dans le temps pour chaque patient a été faite sur les PBMC isolées du patient. Cela implique la nécessité d'avoir les données validées aux 3 temps pour chaque patient. Le contrôle de qualité après DGESeq mène à l'exclusion de 6 échantillons issus de 6 patients différents aboutissant donc à l'exclusion de ces 6 patients de l'étude.

Les variations mises en évidence dans cette étude sont souvent très faibles et diminuent la puissance statistique.

Le top 8% de gènes les mieux classés sur la base du T^2 *Hotelling Score* a été conservé pour l'analyse, soit 1077 gènes sur les 13 466 détectés (**Figure 23**). L'enrichissement des annotations de cet ensemble de gènes a montré que les processus biologiques qui ont été principalement impactés par les procédures de CEC chez l'Homme concernent la réponse aiguë aux composants bactériens, mais surtout le recrutement et l'activation des neutrophiles et des leucocytes et la dégranulation des neutrophiles.



3.2.2 Validation du modèle avec réveil

3.2.2.1 Mesures hémodynamiques, du lactate et de l'hémoglobininémie chez le rat

La pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque (FC) ont été monitorés pour valider que la CEC est suffisante pour maintenir une pression sanguine optimale pendant la chirurgie et pour évaluer l'instabilité hémodynamique potentielle après le réveil de la procédure à la suite de 1 heure de CEC (**Figure 24**).

Pendant la chirurgie et jusqu'à la fermeture des abords, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes Sham et CEC. Le groupe CEC a présenté une hypotension significative 5 heures après le réveil (H+5) ($61,38 \pm 6,95$ mmHg) comparé à pendant la chirurgie ($100,99 \pm 6,38$ mmHg ; $p < 0,01$). A H+5 les pressions artérielles des CEC sont également significativement plus faible que le groupe Sham ($89,39 \pm 2,73$ mmHg, $p < 0,05$).

Le groupe Sham n'a pas présenté de variation de la FC entre le début de la chirurgie et le sacrifice (H+5). En revanche, le groupe CEC présente une diminution significative de la FC mais peu impactante physiologiquement à la fin de la CEC par rapport, respectivement, à la durée de la chirurgie ($p < 0,001$), à la fermeture de la peau ($p < 0,05$) et 5 heures après l'opération ($p < 0,01$).

Pendant la procédure, le groupe CEC a montré une augmentation de la lactatémie artérielle dès la fin de la CEC (fin CEC : $5,2 \pm 0,95$ vs début CEC : $2,13 \pm 0,33$ mmol/L, $p < 0,05$). Celle-ci est restée élevée 5 heures après l'opération. Comparée aux valeurs de lactémie du groupe Sham, l'hyperlactémie dans le groupe CEC est significative à la fin de la CEC (CEC : $5,2 \pm 0,95$; Sham : $2,39 \pm 0,37$ mmol/L, $p < 0,05$) et à H+5 (CEC : $3,73 \pm 0,44$; Sham : $1,34 \pm 0,31$ mmol/L, $p < 0,05$).

L'hémodilution est observée avec une diminution de l'hémoglobininémie dans le groupe CEC depuis la fin de la CEC ($p < 0,01$) et est aggravée à H+5 ($p < 0,001$), entraînant une différence significative avec le groupe Sham à la fin de la CEC ($p < 0,01$) et à H+5 ($p < 0,01$).

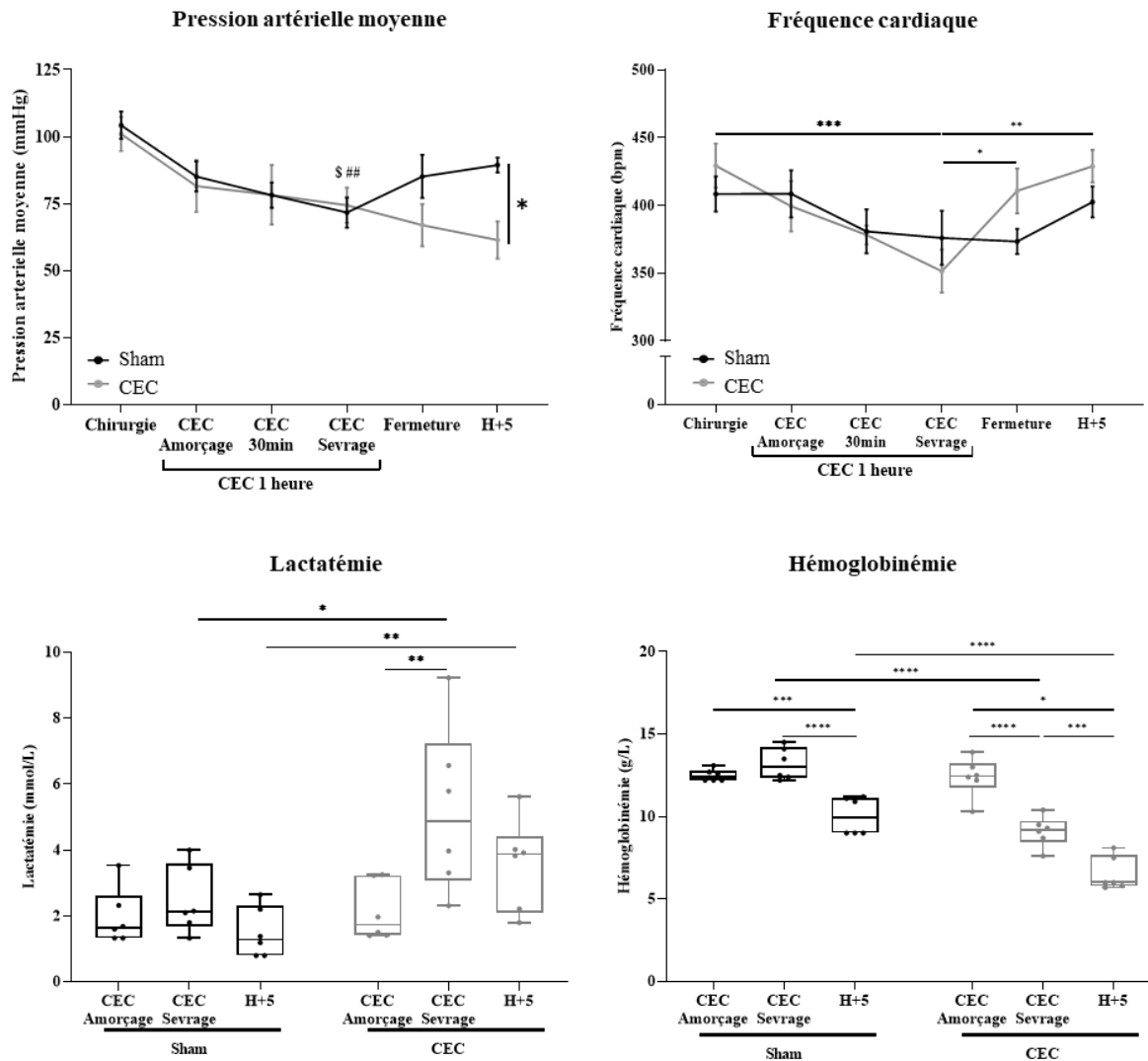


Figure 24 : Surveillance hémodynamique chez le rat

Le groupe Sham (n=6) est représenté en noir et le groupe CEC (n=6) en gris. La pression artérielle moyenne (mmHg), la fréquence cardiaque (battements par minutes) et l'hématocrite (%) sont mesurés au cours de la chirurgie, de l'amorçage de la CEC jusqu'au sevrage de la CEC de 60 min. La significativité est évaluée par un test non-appareillé ANOVA une voie avec test *post hoc* de Dunn's. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; \$: $p < 0,05$ Sham vs Chirurgie; ## : $p < 0,05$ CEC vs Chirurgie

3.2.2.2 Mesures des Gaz du sang, électrolytes

Les gaz du sang et les électrolytes ont été mesurés avant le début de la CEC, à la fin de la CEC et à H+5 pour valider la préservation des paramètres acido-basiques, ventilatoires et l'homéostasie électrolytique sanguins dans le modèle (**Tableau 14**).

Comme attendu, les gaz du sang ont montré des valeurs dans la gamme normale et aucun changement significatif dans le temps ou entre les groupes n'est observé. Concernant les électrolytes, une hyperkaliémie légère mais significative a été observée dans le groupe CEC 5 heures après l'opération (Sham : $4,13 \pm 0,13$ mmol/L ; CEC : $5,03 \pm 0,21$; $p < 0,05$). Une augmentation de la calcémie a également été détectée à la fin de la CEC dans le groupe CEC (début CEC : $1,29 \pm 0,02$; fin CEC : $1,40 \pm 0,02$ mmol/L, $p < 0,05$) suivie d'une diminution à H+5 ($1,10 \pm 0,04$ mmol/L par rapport à la fin CEC, $p < 0,001$). Cinq heures après l'opération, la calcémie était plus basse dans le groupe CEC que dans le groupe Sham (Sham : $1,24 \pm 0,03$; CEC : $1,10 \pm 0,04$ mmol/L ; $p < 0,001$).

Tableau 14 : Mesures des Gaz du sang et des électrolytes

		Amorçage CEC (moyenne ± SEM)	Sevrage CEC (moyenne ± SEM)	H+5 (moyenne ± SEM)
pH	Sham	7,41 ± 0,02	7,37 ± 0,03	7,40 ± 0,02
	CEC	7,42 ± 0,01	7,42 ± 0,04	7,41 ± 0,03
pCO ₂ (mmHg)	Sham	45,47 ± 2,94	46,13 ± 1,88	43,28 ± 3,43
	CEC	42,67 ± 2,52	39,93 ± 4,14	41,15 ± 3,50
pO ₂ (mmHg)	Sham	287,17 ± 35,86	386,68 ± 43,61	329,4 ± 70,54
	CEC	333,12 ± 48,52	436,42 ± 66,41	464,62 ± 43,87
BE (mmol/L)	Sham	4,18 ± 0,59	2,37 ± 1,87	2,15 ± 2,11
	CEC	3,15 ± 0,67	0,80 ± 1,13	1,17 ± 1,14
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	Sham	28,72 ± 0,72	27,98 ± 1,17	27,59 ± 1,77
	CEC	27,47 ± 0,79	25,4 ± 1,24	25,73 ± 1,08
Ca ²⁺ (mmol/L)	Sham	1,32 ± 0,02	1,35 ± 0,03	1,24 ± 0,03
	CEC	1,29 ± 0,02	1,40 ± 0,02 *	1,10 ± 0,04 \$\$\$
Cl ⁻ (mmol/L)	Sham	101,00 ± 0,73	102,33 ± 1,52	100,67 ± 1,56
	CEC	101,33 ± 0,84	102,83 ± 1,17	104,17 ± 0,7
K ⁺ (mmol/L)	Sham	4,90 ± 0,11	5,07 ± 0,14	4,17 ± 0,15
	CEC	4,62 ± 0,15	4,42 ± 0,11	5,04 ± 0,22 *
Na ⁺ (mmol/L)	Sham	139,33 ± 0,56	141,33 ± 4,08	139,33 ± 0,95
	CEC	138,73 ± 0,87	139,17 ± 0,79	140,17 ± 0,79
AGAP	Sham	10,17 ± 0,79	10,00 ± 0,75	12,20 ± 1,45
	CEC	10,50 ± 0,92	11,17 ± 1,17	10,77 ± 0,92
AGAPK	Sham	14,83 ± 0,7	15,25 ± 0,84	16,20 ± 1,45
	CEC	15,17 ± 0,95	15,50 ± 1,15	15,50 ± 0,99

BE: Excès de base, AGAP & AGAPK: trou anionique, CEC: Circulation extracorporelle, Les significativités des différences entre Sham et CEC sont calculés avec un test de kruskall-wallis test et un test post-hoc de Dunn's, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs Sham; \$\$\$ p<0,001 vs Amorçage

3.2.2.3 Mesures biochimiques plasmatiques

Les paramètres mesurés ici sont les mêmes que ceux mesurés sur le plasma de patients inclus lors de cette étude (**Figure 25**), avec les mêmes méthodes et les mêmes consommables afin de pouvoir les comparer par la suite.

Les rats des groupes CEC présentent une augmentation significative de la créatinine (fin CEC : 32,89 ± 3,21 ; H+5 : 73,15 ± 9. 58 U/L, p<0,05) et de l'urée plasmatique (CEC end : 5.18 ± 0,22, H+5 : 14.4 ± 1.46 mmol/L, p<0.0001). Ces résultats sont plutôt en faveur de la mise en place d'une dysfonction rénale avec la diminution ou l'absence de la diurèse.

Ces résultats restent à être complétés par la mesure de biomarqueurs, de fonctions et des dommages rénaux afin d'établir la dysfonction.

L'augmentation de la lactate déshydrogénase dans les groupes CEC dès la fin de la CEC jusqu'à 5 heures en post opératoire (Sevrage CEC : $438,45 \pm 133,70$; H+5 : $976,55 \pm 326,17$ U/L, $p < 0,05$) suggère une rupture des membranes cellulaires et donc de dommages tissulaires et/ou d'hémolyse induits par la procédure de la CEC.

De la même manière, l'apparition de dommages tissulaire musculaire, hépatique et cardiaque est suggéré par une augmentation significative de la créatinine kinase (Sevrage CEC : $333,45 \pm 101,18$; H+5 : $1586,13 \pm 457,30$ U/L, $p < 0,05$) et de l'alanine aminotransférase (Sevrage CEC : $30,21 \pm 7,49$; H+5 : $62,55 \pm 9,77$ g/mL ; $p < 0,05$) ou encore au niveau cardiaque par la Troponine T (Sham : $82,97 \pm 29,19$; CEC : $100,68 \pm 38,72$ g/mL ; $p < 0,05$).

De manière intéressante ces marqueurs plasmatiques évoluent de la même manière que ce qui est retrouvé chez les patients inclus dans l'étude.

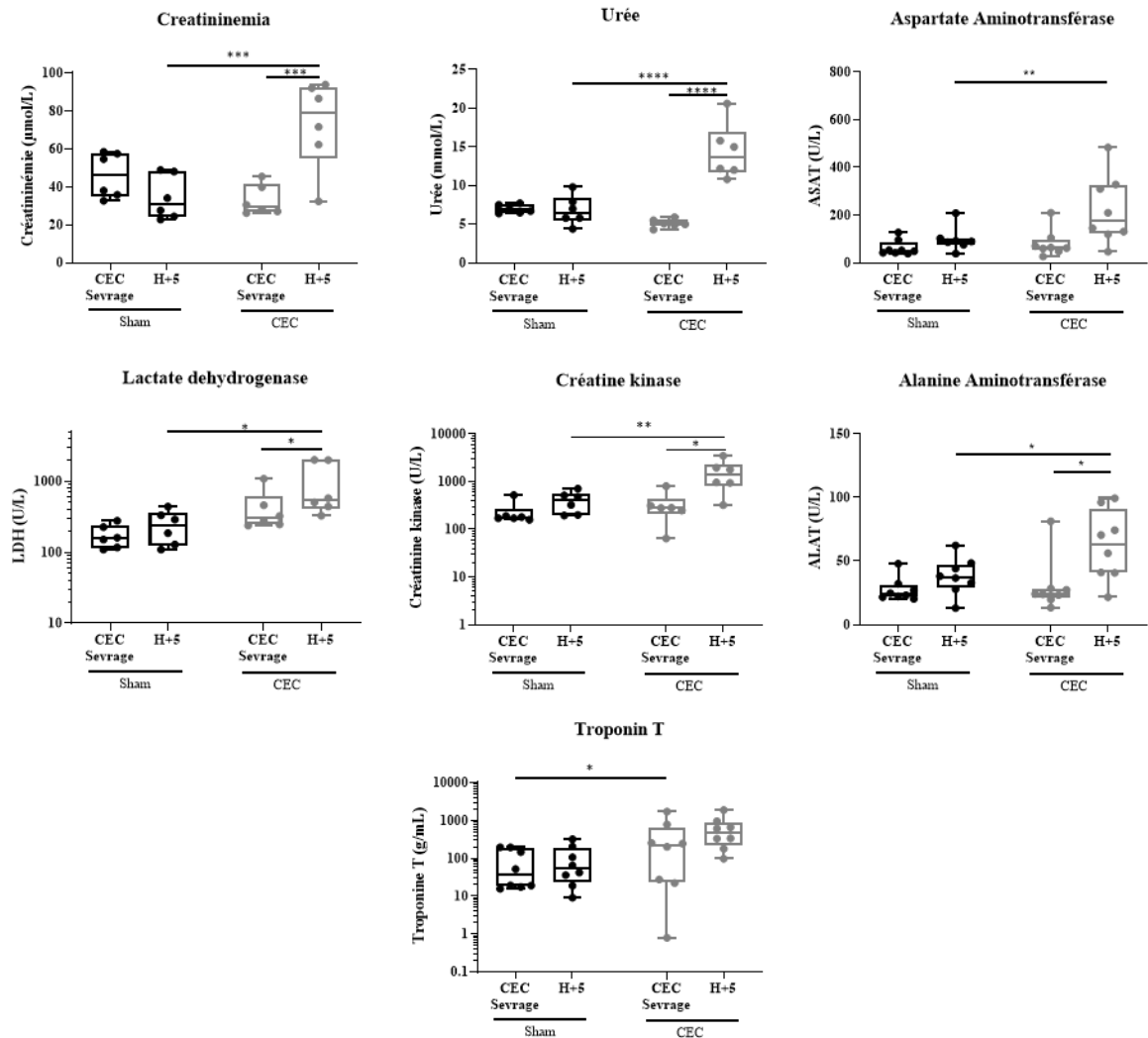


Figure 25 : Mesure de marqueurs plasmatiques rénaux et de stress à partir de sang artériel des rats

Mesure plasmatique des marqueurs rénaux (Créatine et Urée), cardiaque (Troponine T) et des marqueurs de stress ASAT, ALAT, LDH et créatine kinase à partir de plasma de rats opérés des groupes Sham ou CEC. Du plasma a été récupéré au sevrage de la CEC et 5 heures après l'opération (H+5). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests appariés ANOVA à deux voies suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak pour les rats. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.2.2.4 Résultats de l'analyse DGESeq chez le modèle de rat

Une analyse transcriptomique a été réalisée par DGESeq sur des PBMC isolés à la fin de la CEC d'une durée de 1 heure. Après analyse, près d'un tiers des échantillons (4 échantillons sur 15) a dû être exclu de l'analyse car ils présentaient un nombre insuffisant de gènes lus ou détectés. En considérant un seuil de niveau d'expression $\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) > 2$ ou $\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) < -2$, 333 gènes sont exprimés de manière différentielle entre les groupes Sham et CEC. Parmi ces 333 gènes, 290 gènes ont un niveau de transcription $\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) > 2$ et 93 gènes avec un niveau $\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) < -2$. (**Figure 26**). L'enrichissement d'ontologies de ces gènes a montré que les processus biologiques principalement touchés par les procédures de CEC concernaient le processus d'inflammation aiguë, de régulation du métabolisme, de la réponse aiguë aux composants bactériens et la production de cytokines.

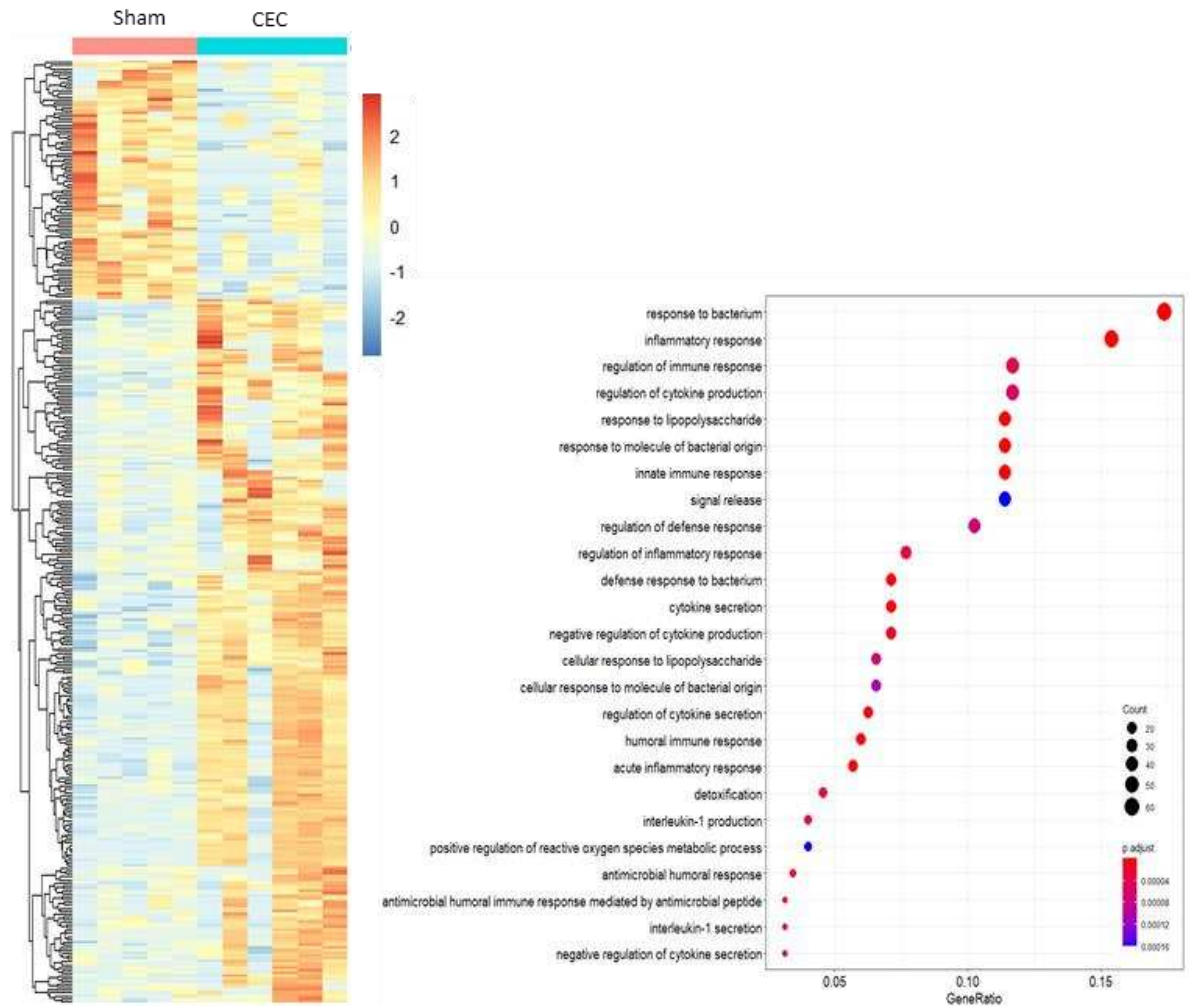


Figure 26 : L'analyse du transcriptome a été réalisée à partir d'ARN extraits des PBMC de rats ayant subi une CEC.

L'analyse du transcriptome a été réalisée sur des PBMC de rats prélevés au sevrage de CEC. La *heatmap* représente les variations d'expressions interindividuels pour les gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés par leur ($\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) > 2$ ou $\log_2\text{Ratio}(\text{CEC}/\text{Sham}) < 2$). L'enrichissement des processus biologiques a été traité sur les gènes sélectionnés et représenté en fonction du *GeneRatio* et du *Count* et de la *pvalue* ajustée.

3.3 Efficacité des molécules *in vitro*

3.3.1 RT-qPCR

Afin de vérifier la capacité des molécules ciblant l'ISR à diminuer *in vitro* l'expression de cytokines, des PBMC de sang total artérielle de rat ont été isolés, mis en culture et stimulés par du LPS en présence ou non de plusieurs molécules développées par InFlectis BioScience. Ces molécules ciblent l'ISR en augmentant la phosphorylation de eIF2 α , en prolongeant l'atténuation de la synthèse protéique en condition de stress uniquement. Ces molécules ont par ailleurs un profil pharmacocinétique favorable à leur administration par voie orale ou par injection.

Trois heures après l'induction du stress par le LPS, nous observons par RT-qPCR (Figure 27) que l'exposition au LPS induit une augmentation de l'expression de transcrits de facteurs pro-inflammatoires, IL-6 (Ctrl : $1,0 \pm 0,36$; LPS : $20,5 \pm 8,7$), TNF- α (Ctrl : $1,0 \pm 0,35$; LPS : $11,3 \pm 5,17$) et IL-1 β (Ctrl : $1,0 \pm 0,1$; LPS : $9,29 \pm 4,74$). Nous observons également une augmentation d'expression de Ppp1r15a induit par le LPS (Ctrl : $1,0 \pm 0,2$; LPS : $3,27 \pm 1,85$) suggérant une activation de l'ISR à la suite du stress imposé par le LPS.

L'exposition des PBMC primaires stimulé au LPS en présence des molécules Cpd-2, Cpd-3 et l'IFB-088 provoque une diminution de l'expression des transcrits pro-inflammatoire de manière concentrations-dépendants. La diminution de l'expression de Ppp1r15a dans les PBMC 3 heures après exposition au LPS pourrait être expliquée par une diminution du stress induit par les molécules, mais la faible variation ne permet pas de conclure sur ce point. La molécule la plus active serait le Cpd-2 qui montre aux concentrations les plus faibles une plus grande diminution des transcrits des facteurs pro-inflammatoires : IL-6 (10 μ M : $0,23 \pm 0,01$; 5 μ M : $0,42 \pm 0,03$; 1 μ M : $0,49 \pm 0,11$), IL-1 β (10 μ M : $0,09 \pm 0,01$; 5 μ M : $0,15 \pm 0,05$; 1 μ M : $0,52 \pm 0,02$) et TNF- α (10 μ M : $0,08 \pm 0,07$; 5 μ M : $1,77 \pm 1,57$; 1 μ M : $0,80 \pm 0,04$).

Cependant ces résultats sont pris avec précaution pour la sélection de la première molécule à tester sur le modèle de CEC au vu du faible nombres d'expériences indépendantes, entre 2 à 5 (1 expérience indépendante correspondant à l'expérience sur les PBMC provenant de 1 rat).

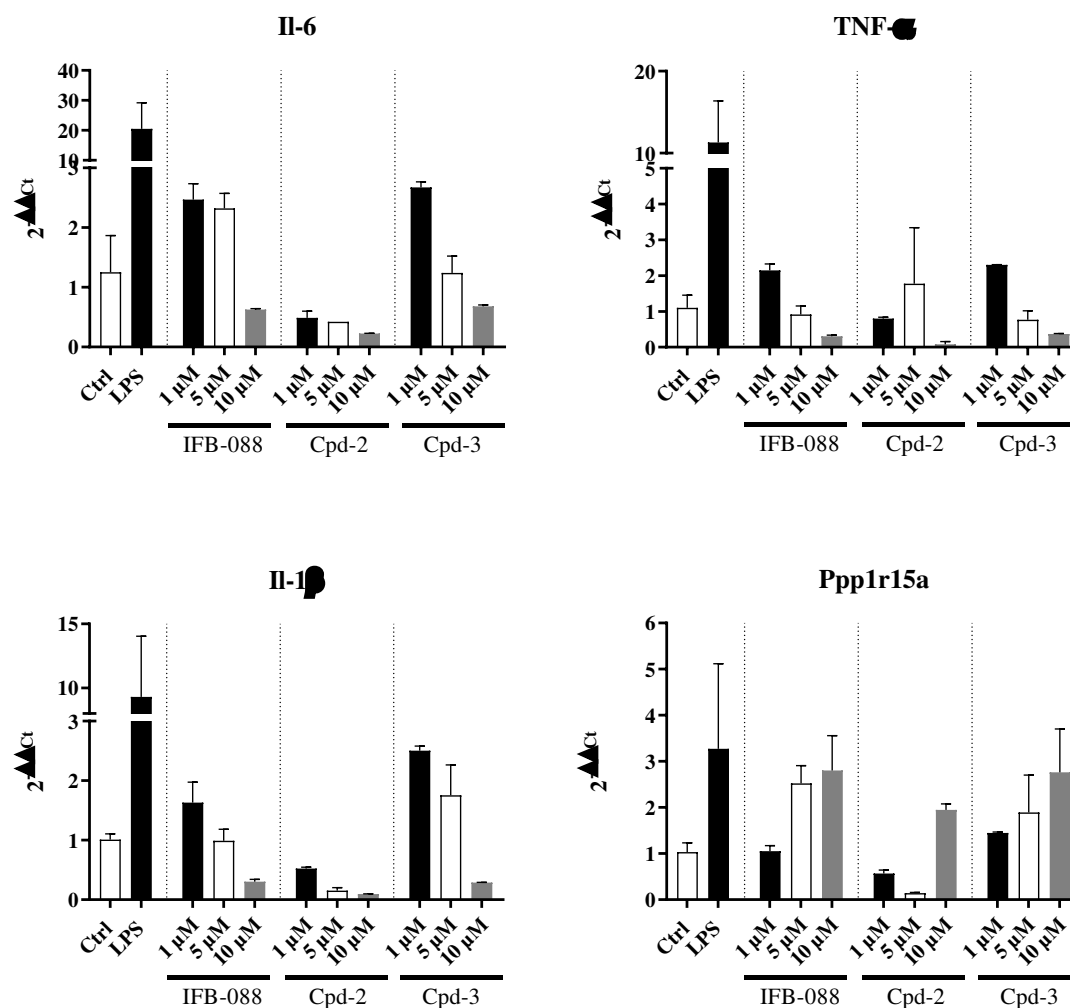


Figure 27 : Evaluation des niveaux de transcrits isolés de PBMC mis en culture en présence de LPS et de molécule ciblant l'ISR

Les PBMC isolés de rats ont été mis en culture, exposés à 0,5 μM, 1 μM ou 5 μM de IFB-088, Cpd-2 ou Cpd 3 pendant 1 heure puis incubés pendant 3 heures avec du LPS. Les contrôles Ctrl n'ont pas été exposés au LPS ou aux molécules. Le contrôle PS n'a été exposé qu'au LPS. Les niveaux d'expressions de transcrits des cytokines IL-6, IL-1β et TNF-α ainsi que de Ppp1r15a sont mesurés par RT-qPCR. La significativité a été testée par un test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn's.

3.3.1.1 Dosage des cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant

Afin de confirmer l'efficacité du Cpd-2 à réduire *in vitro* l'activation de l'inflammation et de pouvoir ensuite le sélectionner pour l'évaluer sur le modèle de CEC développé chez le rat, une mesure des IL-6 et des TNF- α par ELISA sur le surnageant de culture a été réalisée (**Figure 28**).

Comme attendu l'exposition au LPS est à l'origine d'une augmentation significative de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires comparés au Ctl : IL-6 (Ctl : $25,21 \pm 17,26$; LPS : $699,3 \pm 329,0$ pg/mL, $p < 0,05$) et TNF- α (Ctl : $12,63 \pm 4,04$; LPS : $163,7 \pm 60,16$ pg/mL, $p < 0,05$). La mesure de l'IL-6 ici tend à confirmer que les molécules administrées permettraient de diminuer les concentration d'IL-6 secrétées par les PBMC dans le milieu.

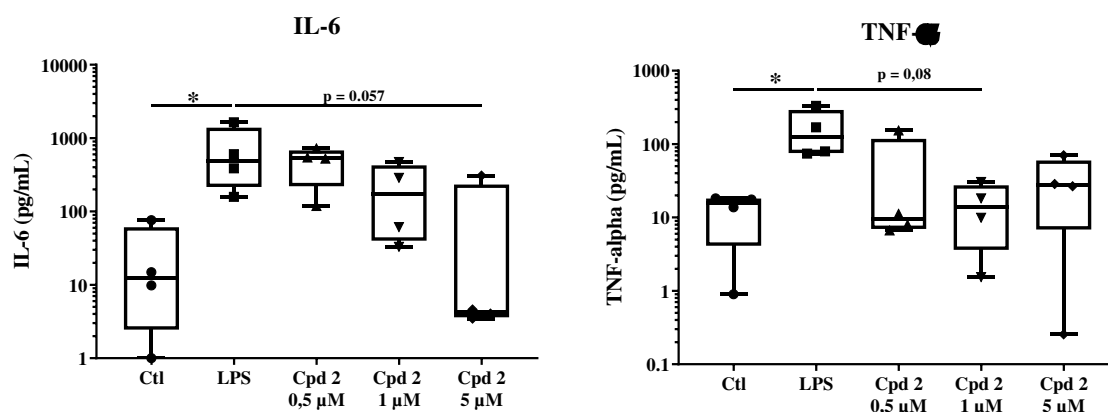


Figure 28 : Mesure des IL-6 et du TNF- α dans le surnageant de culture des PBMC isolés de rats stressés au LPS

Les PBMC isolés de rats ont été mis en culture, exposés à 0,5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M de Cpd-2 ou sans Cpd-2 (Ctl et LPS) pendant 1 heure puis incubés pendant 3 heures avec du LPS (LPS et Cpd-2) ou non (Ctl). Les concentrations de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α sont mesurées par ELISA. La significativité a été testée par un test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn's, * $p < 0,05$.

3.4 Evaluation de l'effets des molécules dans la CEC chez le rat

3.4.1 Test du Cpd-2 sur le modèle de CEC

Les effets du Cpd-2 ont été évalués dans la CEC. Ces effets ont été comparés aux Sham et aux rats du groupe contrôle CEC. Pour cela, la première étape a consisté à monitorer les paramètres hémodynamiques (fréquence cardiaque et les pressions artérielles moyennes) ainsi que la quantité de vasopresseurs (Phénylèphrine) administré afin de permettre d'atteindre l'objectif et le maintien des pressions artérielles durant la procédure. L'augmentation de la quantité de vasopresseurs nécessaire pour le bon déroulé de la procédure est souvent associée à des instabilités hémodynamiques post opératoires, ce qui ont été mises en évidence par l'hypotension 5h après le réveil dans le groupe CEC comparé aux Sham déjà décrite dans la partie mis au point du modèle.

L'administration du Cpd-2 à la dose de 2 mg/kg provoque une diminution de la pression artérielle moyenne dès le début de la chirurgie (Cpd-2 : $68,59 \pm 2,84$ mmHg ; Sham : $98,45 \pm 5,80$, $p < 0,5$) et une diminution de FC (Cpd-2 : $328,74 \pm 11,08$; Sham : $396,13 \pm 29,55$ bpm, $p < 0,5$) comparé aux Sham (**Figure 29**). L'hypotension des rats observé après l'administration du Cp2 est maintenu dans le temps alors que la fréquence cardiaque revient à des valeurs normales 5h après le réveil (H+5 : $438,69 \pm 23,96$ bpm). Ces effets sont fortement similaires à une activité $\alpha 2$ -adrénergique du Cpd-2, non souhaitée pour cette étude, qui est retrouvé par exemple dans le Guanabenz dont le Cpd-2 est un dérivé.

L'administration de cette molécule a permis la diminution de la quantité de Phénylèphrine administrée durant la procédure (Cpd-2 : $4,6 \pm 2,28$; CEC : $25,13 \pm 2,28$ $\mu\text{g/h}$, $p < 0,5$) pour atteindre les objectifs du maintien de la pression artérielle moyenne minimale. Cette diminution durant la circulation extracorporelle est accompagnée de l'amélioration du score comportemental évalué pendant la période de réveil. Cependant, l'effet à la fois hypotenseur et bradycardisant observé a nécessité l'arrêt des tests avec cette molécule. Afin de vérifier si la molécule seule était à l'origine de cet effet ou si cela était dû à une potentielle interaction médicamenteuse durant la procédure de CEC, cette molécule et les autres molécules candidates ont été administrées à des animaux vigiles où leurs constantes hémodynamiques ont été suivies.

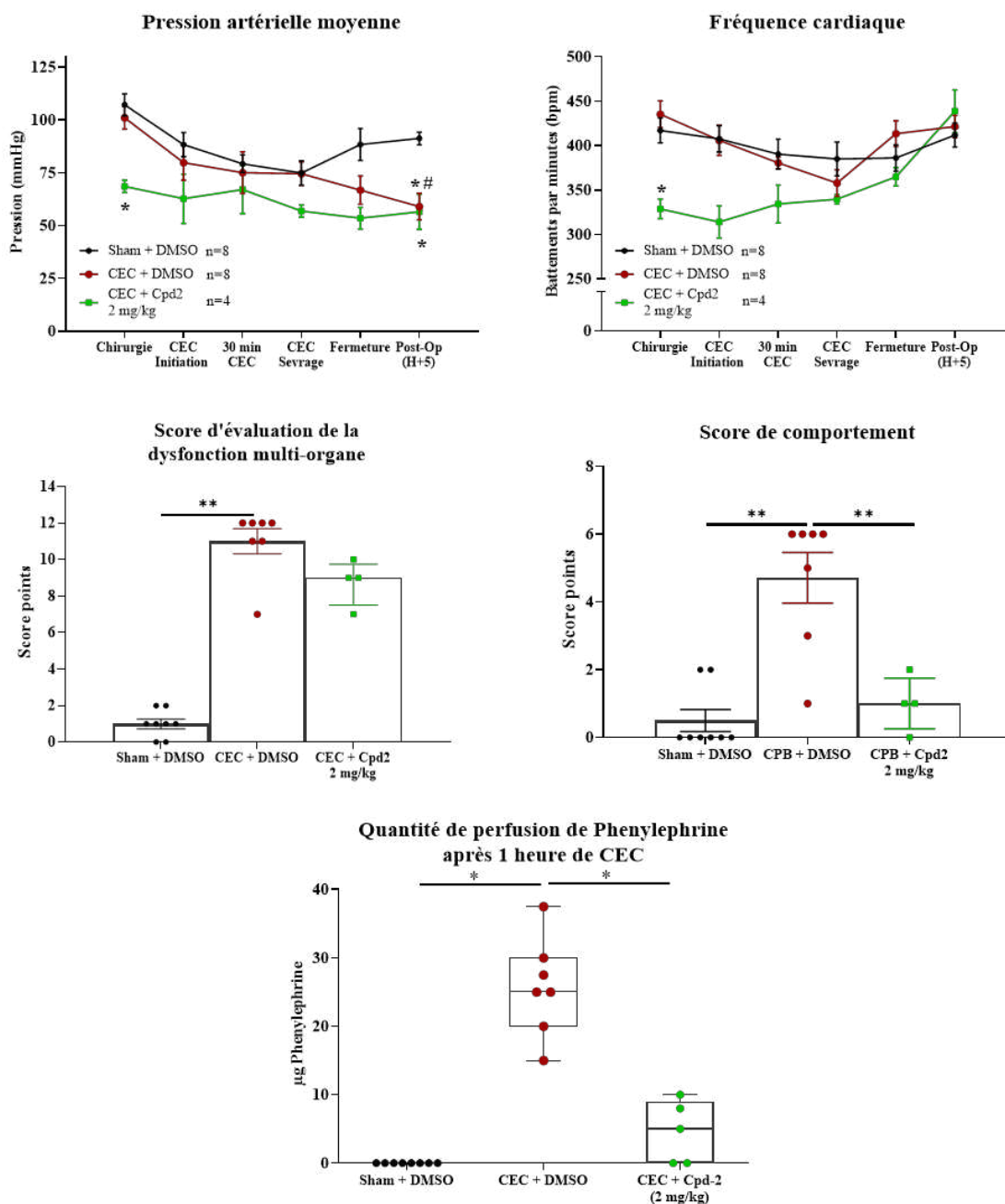


Figure 29 : Monitoring hémodynamique au cours de la CEC et en post-opératoire avec ou sans le Cpd-2 administré à 2mg/kg avant la chirurgie

Le groupe Sham (n=8) est représenté en noir, le groupe CEC seule (n=8) en gris et avec le Cpd-2 (n=4) en vert. La pression artérielle moyenne (mmHg) et la fréquence cardiaque (bpm) ont été monitorés pendant la procédure. Chaque point (pendant la chirurgie, à l'initiation de la CEC, au milieu de la CEC, au sevrage de la CEC, fermeture de la peau et à H+5) est une moyenne de 10 minutes d'enregistrements. La quantité de vasopresseur, la Phénylèphrine, a été mesurée en fin de CEC et les score d'évaluation du comportement ou de la dysfonction multi-organe ont été générés. L'analyse statistique a été effectuée par des tests ANOVA à deux voies appariées avec le test de comparaisons multiples de Sidak ou test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. * p<0,05 vs Sham, # p<0,05 vs Chirurgie

3.4.2 Tests sur animal vigile des petites molécules IFB

Afin de vérifier que l'activité du Cpd-2 et des autres molécules sélectionnées pour cette étude présente ou non une activité bradycardisante ou hypotensive, nous avons testé sur des animaux vigils les effets de ces molécules sur les paramètres hémodynamiques en l'absence des autres substances administrés pendant la procédure de CEC afin d'éviter de potentiel interaction médicamenteuse.

Afin de comparer le Cpd-2 et le Cpd-3, nous avons utilisé ici plusieurs molécules de références qui sont l'IFB-088 (principe actif IFB-088 et acétate), molécule déjà évaluée en phase 1 d'essai clinique sur volontaires sains et en cours de documentation pour une demande d'essai clinique de phase 2 en ALS et CMT, et le Cpd-1 qui présente une activité $\alpha 2$ -adrénergique *in vitro* connue.

Cette expérience (**Figure 30**) confirme que l'activité du Cpd-1 est bien à l'origine d'une hypotension et d'une bradycardie, nous montrons que, comparé au contrôle (DMSO/NaCl), les molécules IFB-088 et le Cpd-3 n'ont aucun effet sur les pressions artérielles ou les fréquences cardiaques.

Le Cpd2 présente ici les mêmes effets hypotenseur (Cpd-1 : $74,41 \pm 2,14$; Cpd- 2 : $68,03 \pm 2,23$; NaCl/DMSO : $93,76 \pm 4,39$ mmHg, $p < 0.05$) et bradycardisant (Cpd-1 : $295,2 \pm 17,26$; Cpd- 2 : $342,46 \pm 5,07$; NaCl/DMSO : $431,82 \pm 10,9$ bpm, $p < 0.05$) que le Cpd-1 qui lui a démontré une activité agoniste $\alpha 2$ -adrénergique similaire dans un essai cellulaire fonctionnel humain pour évaluer l'activité agoniste sur le récepteur $\alpha 2$ -adrénergique (CPd1 : $EC_{50} \sim 7,6 \mu M$ et Cpd-2 : EC_{50} : non calculée)

Au vu de ces résultats, l'étude du Cpd-2 n'a pas été poursuivie dans ce modèle. Les molécules Cpd-3 et l'IFB-088, qui elles modulent l'ISR sans activité hypotensive et bradycardisante chez le rat, ont été évalués dans le modèle de CEC.

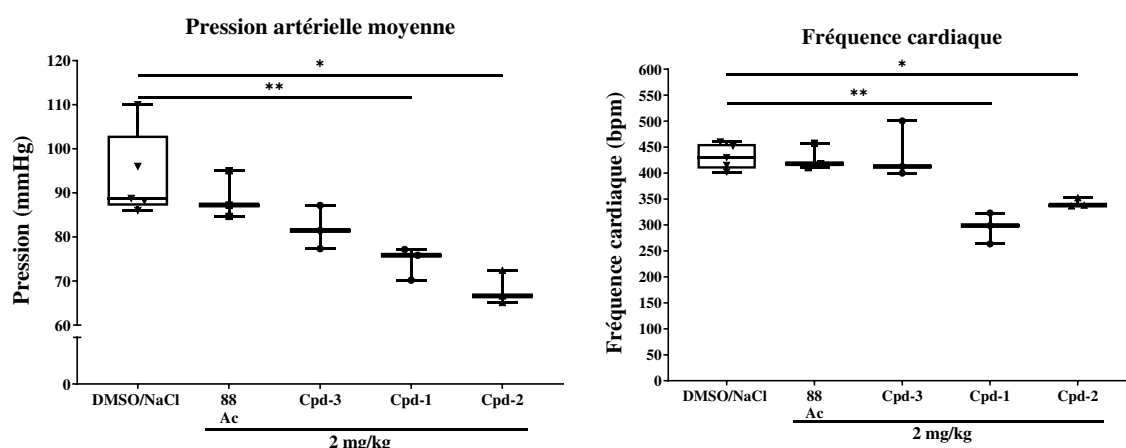


Figure 30 : Mesures hémodynamiques des rats ayant reçu un bolus *i.p.* de molécule à tester chez les animaux vigiles.

La mesure des paramètres hémodynamiques par cathétérisme carotide permet de mesurer les pressions artérielles moyenne et la fréquence cardiaque. Cpd-1 : molécule contrôle avec activité α_2 -adrénergique connu, Cpd-2 et Cpd-3 : molécules sélectionnés pour tests sur le modèle de CEC. L'analyse statistique a été effectuée par un test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. * p < 0,05 et ** p < 0,01 vs NaCl/DMSO, n=3-5/groupe.

3.4.3 Test du Cpd-3 et de l'IFB-088 sur le modèle de CEC

3.4.3.1 Hémodynamique

Comme précédemment pour le Cpd-2, le monitoring des paramètres hémodynamiques et la mesure de la quantité de Phénylèphrine injecté au cours de la procédure ont été réalisés chez les animaux traités au Cpd-3 aux doses 0,3 mg/kg et 1 mg/kg et à l'IFB-088 à la dose de 2 mg/kg.

Alors que la fréquence cardiaque n'est pas impactée durant la chirurgie et après la circulation extracorporelle au moment de la fermeture et en postopératoire par l'administration de molécules, les pressions artérielles moyennes après le sevrage de CEC montrent des différences significatives entre les groupes Sham, CEC et les groupes traités (**Figure 31**). Comme déjà vu précédemment, une hypotension s'est installée en postopératoire chez les rats du groupe CEC. Le groupe Cpd-3 à 1 mg/kg et le groupe IFB-088 présentent une tendance à l'amélioration des pressions artérielles moyennes en postopératoire comparé au CEC même si les différences ne sont pas statistiquement significatives. En revanche, cette amélioration est statistiquement significative avec le Cpd-3 administré à la dose de 0,3 mg/kg qui permet même la normalisation des pressions artérielles moyennes à 5 heures en postopératoire (Sham : $91,99 \pm 2,67$; CEC : $58,36 \pm 5,21$; $91,84 \pm 6,11$ mmHg).

De façon similaire au Cpd-2, nous observons une diminution significative de la quantité perfusée de phénylèphrine durant les 60 minutes de CEC pour toutes les molécules testées à toutes les doses administrées (CEC : $25,13 \pm 2,28$ vs Cpd-3 à 1 mg/kg : $16,06 \pm 2,16$; Cpd-3 à 0,3 mg/kg : $14,08 \pm 1,85$; IFB-088 : $14,42 \pm 1,8$ µg/hr, $p < 0,01$).

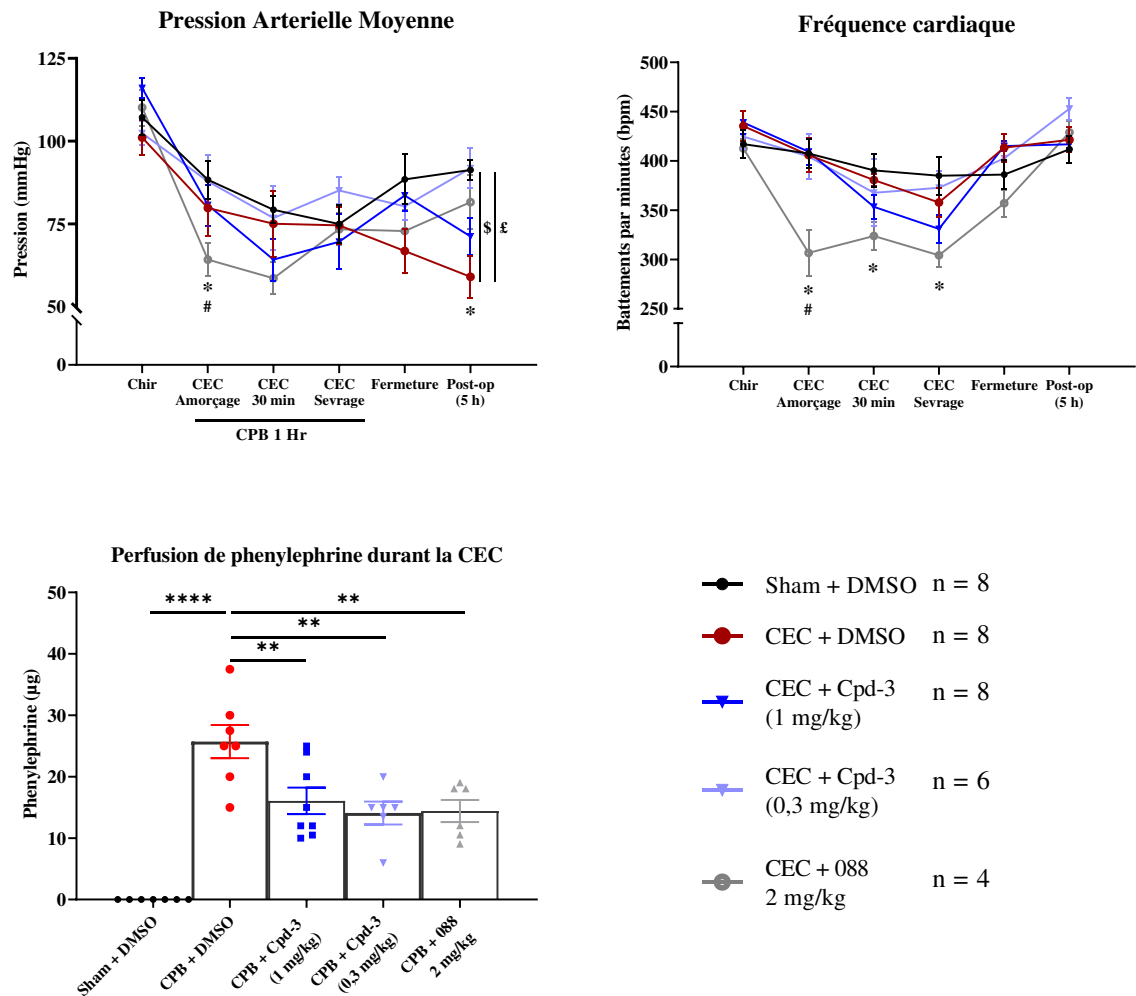


Figure 31 : Mesure hémodynamique et de la quantité de phényléphrine administrée durant la CEC avec ou sans molécules administrée avant la chirurgie

Les groupes Sham (n=8), CEC seule (n=8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=8 et 6) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. La pression artérielle moyenne (mmHg) et la fréquence cardiaque (bpm) ont été monitorés pendant la procédure. Chaque point (pendant la chirurgie, à l'initiation de la CEC, au milieu de la CEC, au sevrage de la CEC, fermeture de la peau et à H+5) est une moyenne de 10 minutes d'enregistrements. La quantité de vasopresseur, la Phénylèphrine, a été mesurée en fin de CEC. L'analyse statistique a été effectuée par des tests ANOVA à deux voies appariées avec le test de comparaisons multiples de Sidak ou test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. * $p < 0,05$ vs Sham; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs Chirurgie; \$ $p < 0,05$ vs Sham; £ $p < 0,05$ vs Cpd-3 (0,3 mg/kg)

3.4.3.2 Gaz du sang, électrolytes et hémoglobinémie

La mesure des gaz du sang chez les Sham, CEC ou traités ne montre aucune différence sur les paramètres du pH, de la pression partielle en dioxyde de carbone, de la pression partielle en oxygène, et sur mesures de bicarbonates ou d'excès de base (**Tableau 15**).

De la même manière, il n'y a aucune différence significative entre les groupes et au cours du temps dans les concentrations en électrolytes qui sont le sodium, le potassium, le calcium et le chlore.

En revanche, et comme lors de la mise au point, nous mettons en évidence une hémodilution dans tous les groupes recevant une circulation extracorporelle. Cette hémodilution a été limitée lors de la procédure afin qu'elles respectent les critères d'inclusion des animaux.

Tableau 15 : Mesure des gaz du sang, des électrolytes et de l'hémoglobininémie dans le modèle de CEC avec ou sans les molécules à tester

Paramètre	Groupe	Initiation de la CEC	Sevrage de la CEC	Post-op (5 Hr)
pH	Sham + DMSO	7,41 ± 0,03	7,35 ± 0,04	7,39 ± 0,00
	CEC + DMSO	7,42 ± 0,01	7,43 ± 0,05	7,37 ± 0,02
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	7,39 ± 0,02	7,37 ± 0,02	7,35 ± 0,04
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	7,41 ± 0,03	7,37 ± 0,03	7,40 ± 0,05
	CEC+088 (2 mg/kg)	7,49 ± 0,02	7,45 ± 0,04	7,34 ± 0,02
pCO₂ (mmHg)	Sham + DMSO	44,28 ± 4,93	45,53 ± 2,52	42,43 ± 1,59
	CEC + DMSO	43,82 ± 2,80	38,16 ± 5,30	44,63 ± 3,94
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	47,73 ± 3,28	43,56 ± 3,29	43,58 ± 6,90
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	46,83 ± 3,32	47,47 ± 2,83	45,45 ± 10,92
	CEC+088 (2 mg/kg)	35,65 ± 1,92	36,07 ± 2,27	43,78 ± 3,48
Cbicarb (mmol/L)	Sham + DMSO	27,98 ± 0,84	27,18 ± 1,58	25,50 ± 1,30
	CEC + DMSO	28,44 ± 0,77	24,70 ± 1,78	25,45 ± 1,49
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	28,81 ± 1,13	25,63 ± 1,14	26,70 ± 1,89
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	29,92 ± 2,83	27,65 ± 0,71	32,60 ± 2,20
	CEC+088 (2 mg/kg)	27,07 ± 0,50	24,04 ± 0,75	29,40 ± 1,06
Sodium (mmol/L)	Sham + DMSO	140,00 ± 0,41	143,75 ± 6,16	140,00 ± 1,73
	CEC + DMSO	139,00 ± 1,12	139,00 ± 1,06	140,00 ± 1,22
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	139,25 ± 0,65	139,00 ± 0,42	139,13 ± 0,75
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	139,00 ± 1,46	139,00 ± 0,73	142,00 ± 0,63
	CEC+088 (2 mg/kg)	138,00 ± 0,37	138,83 ± 0,60	139,00 ± 0,67
Potassium (mmol/L)	Sham + DMSO	4,85 ± 0,13	5,30 ± 0,17	4,00 ± 0,09
	CEC + DMSO	4,66 ± 0,21	4,52 ± 0,18	4,93 ± 0,32
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	5,09 ± 0,11	4,78 ± 0,21	4,81 ± 0,14
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	4,95 ± 0,22	4,65 ± 0,13	4,40 ± 0,20
	CEC+088 (2 mg/kg)	4,95 ± 0,10	4,23 ± 0,05	4,35 ± 0,18
Calcium (mmol/L)	Sham + DMSO	1,32 ± 0,03	1,30 ± 0,04	1,26 ± 0,04
	CEC + DMSO	1,28 ± 0,03	1,40 ± 0,02	1,11 ± 0,06
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	1,35 ± 0,01	1,39 ± 0,04	1,08 ± 0,04
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	1,29 ± 0,08	1,40 ± 0,02	1,13 ± 0,02
	CEC+088 (2 mg/kg)	1,31 ± 0,01	1,40 ± 0,02	1,15 ± 0,03
Chlore (mmol/L)	Sham + DMSO	101,75 ± 0,85	103,75 ± 1,93	101,33 ± 2,02
	CEC + DMSO	102,00 ± 0,94	103,40 ± 1,35	104,75 ± 0,85
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	99,50 ± 0,46	100,63 ± 0,50	102,75 ± 1,16
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	98,83 ± 0,79	99,83 ± 0,75	100,83 ± 0,98
	CEC+088 (2 mg/kg)	99,50 ± 0,34	100,83 ± 0,54	101,75 ± 0,91
Hgb (g/dL)	Sham + DMSO	12,55 ± 0,22	13,58 ± 0,50	10,03 ± 0,59
	CEC + DMSO	12,84 ± 0,32	8,50 ± 0,43	6,83 ± 0,58
	CEC + Cpd-3 (1 mg/kg)	12,76 ± 0,21	9,04 ± 0,45	6,56 ± 0,36
	CEC + Cpd-3 (0,3 mg/kg)	11,62 ± 0,63	9,47 ± 0,72	7,78 ± 0,63
	CEC+088 (2 mg/kg)	7,78 ± 0,63	9,65 ± 0,32	7,85 ± 0,35

DMSO : diméthyl sulfoxyde ; CEC : circulation extracorporelle ; pCO₂ : pression partielle en CO₂ ; Hgb : hémoglobininémie

3.4.3.3 Biochimie peropératoire et scores

A partir de petits prélèvements de sang artérielle au moment de l'amorçage, du sevrage et à 5h en postopératoire différents paramètres biochimiques ont été évalués, notamment les paramètres rénaux comme l'urée et la créatinine ou encore les lactates, témoins de l'état d'ischémie tissulaire (**Figure 32**).

Dans un premier temps, nous observons une augmentation non significative des concentrations sanguines en urée qui semble atténué dans les groupes recevant le Cpd-3 à 0,3 mg/kg et le IFB-088. Ce constat est également fait avec les mesures de créatinémie où cette fois l'augmentation comparé aux Sham, est significative dans le groupe CEC à 5h en postopératoire (Sham : $0,52 \pm 0,07$; CEC : $1,65 \pm 0,16$ mg/dL, $p < 0,01$). L'administration du Cpd-3 (0,3 mg/kg) en pré opératoire permet de réduire significativement la concentration en créatinine plasmatique 5h après l'opération comparé aux CEC contrôles (Cpd-3 (0,3 mg/kg) : $1,01 \pm 0,13$ mg/dL, $p < 0,05$). Cela suggérerait que ce traitement améliorerait la fonction rénale. Ce constat est renforcé par le fait que les animaux traités avec cette molécule présentaient une diurèse alors que les rats du groupe CEC n'urinait pas.

Dans un 2^{ème} temps, nous observons une augmentation de la lactatémie entre l'amorçage et le sevrage de la CEC pour tous les groupes subissant une CEC. Cette augmentation en postopératoire s'avère être significative chez les rats du groupe CEC comparé aux Sham (Sham : $1,3 \pm 0,27$; CEC : $4,75 \pm 1,05$ mmol/L, $p < 0,05$) ce qui indique une souffrance tissulaire potentiellement délétère à long terme. L'administration du Cpd-3 à 1 mg/kg et 0,3 mg/kg induit une normalisation de la lactatémie en postopératoire (Cpd-3 (1 mg/kg) : $1,9 \pm 0,27$; Cpd-3 (0,3 mg/kg) : $1,02 \pm 0,33$ $p < 0,05$ vs CEC). Encore une fois, l'IFB-088 montre un comportement similaire au Cpd-3, 0,3 mg/kg

Enfin, ces résultats bénéfiques sont appuyés par une amélioration du score d'évaluation de la dysfonction multi organes (CEC : $11 \pm 0,69$; Cpd-3 (0,3 mg/kg) : $4,67 \pm 1,20$, $p < 0,05$) et du score de comportement (CEC : $4,7 \pm 0,75$; Cpd-3 (0,3 mg/kg) : $1,16 \pm 0,48$, $p < 0,01$) chez les rats traités avec le Cpd-3 à la dose de 0,3 mg/kg. Ce qui indique un meilleur état de santé général des animaux traités.

Le traitement avec l'IFB-088 montre des effets similaires mais ne présente aucune différence statistiquement significative dû au faible effectif de ce groupe (n=4 seulement).

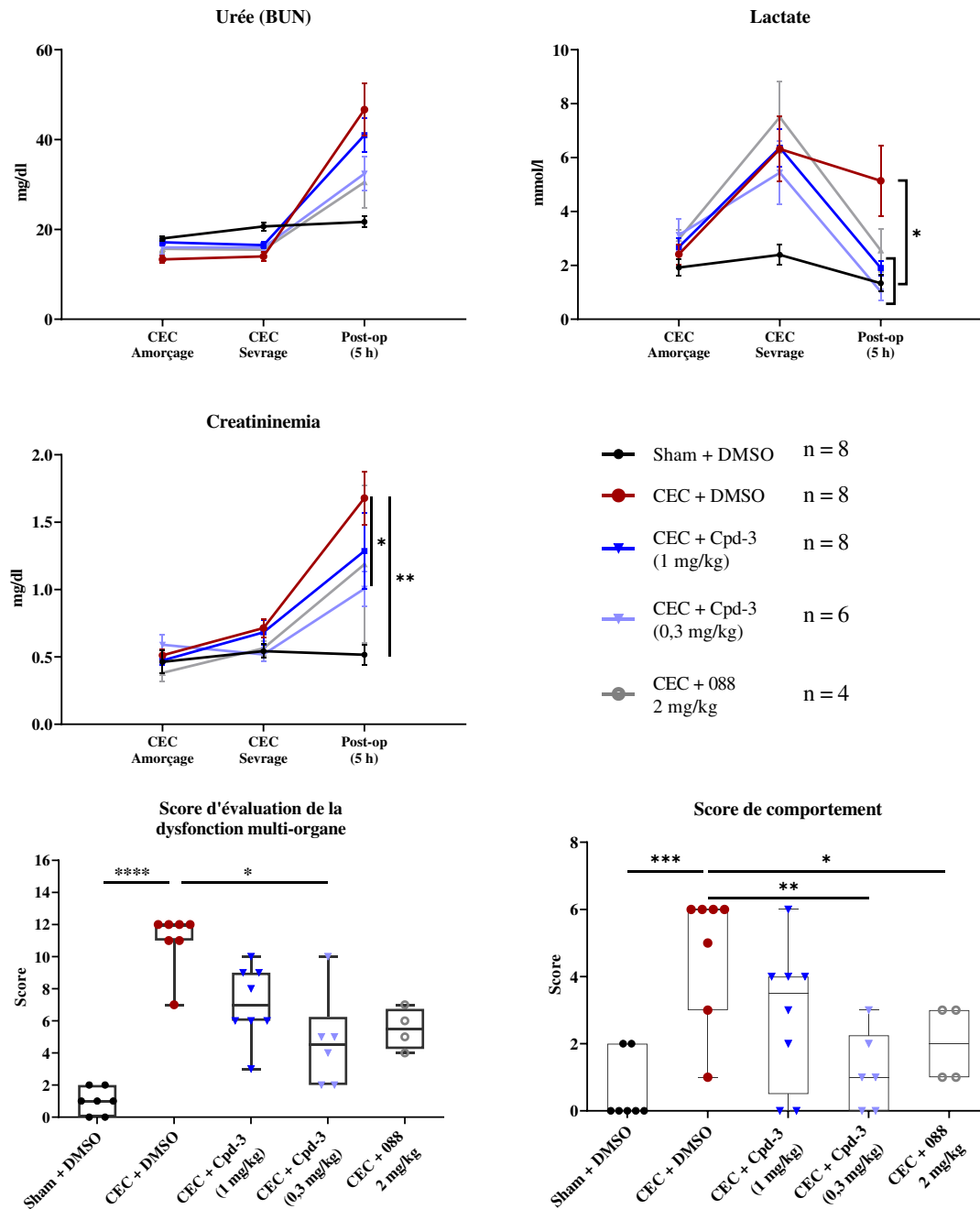


Figure 32 : Paramètres biochimiques mesurés au décours de la procédure et établissement des scores comportementaux et d'évaluation de la présence d'une dysfonction d'organe avec ou sans molécules administré avant la chirurgie

Le groupe Sham (n=8), le groupe CEC seule (n=8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=8 et 6) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. La créatininémie, l'urémie et la lactatémie sont mesurés à partir de 94 μ L de sang artériel à l'amorçage de la CEC, au sevrage de la CEC et en post-op (5 h). L'établissement des scores d'évaluation du comportement et de la dysfonction multi-organe a eu lieu au moment du sacrifice. L'analyse statistique a été effectuée par des tests ANOVA à deux voies appariées avec le test de comparaisons multiples de Sidak ou test de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***** p< 0,001, # p<0,05

3.4.3.4 Biochimie plasmatique

Afin de compléter les mesures effectuées au décours de la procédure, des prélèvements de plasma ont été effectués au sevrage de la CEC puis lors du sacrifice de l'animal à 5 heures postopératoire. Comme précédemment, l'analyse de plus de paramètres biochimiques ont été effectués à partir de ces prélèvements (**Figure 33**).

Aucun des traitements n'a permis de montrer un effet significatif sur l'expression de lactate déshydrogénase, de la troponine T.

En revanche, la CEC induit une augmentation significative en postopératoire de la créatine kinase (Sevrage de CEC : $336,98 \pm 75,68$; Post-op (5h) : $1481,84 \pm 367,46$ UA, $p < 0,01$), de l'aspartate aminotransférase (Sevrage de CEC : $30,21 \pm 7,48$; Post-op (5h) : $62,55 \pm 9,77$ UA, $p < 0,01$), de l'alanine aminotransférase (Sevrage de CEC : $80,96 \pm 20,05$; Post-op (5h) : $222,05 \pm 50,57$ UA, $p < 0,01$) et semble également interférer avec la diminution de l'hémolyse en postopératoire que l'on observe par exemple chez les Sham.

Le Cpd-3 à 1 mg/kg et le IFB-088, par son faible effectif ($n=4$), ne permettent pas de réduire de façon significative l'augmentation des concentrations en CK, l'aspartate aminotransférase, de l'alanine aminotransférase observé dans le groupe CEC contrôle. En revanche, les rats ayant reçu le Cpd-3 à la dose de 0,3 mg/kg ne présentent pas d'augmentation significative de la créatine kinase à 5h en postopératoire. Ce même constat peut être fait pour l'aspartate aminotransférase et l'alanine aminotransférase. De plus, ce groupe Cpd-3 à 0,3 mg/kg se rapproche le plus du groupe Sham pour l'indice d'hémolyse avec une diminution significative de celle-ci en postopératoire (Sevrage de CEC : $73,60 \pm 20,84$; Post-op (5h) : $20,67 \pm 10,74$, $p < 0,01$).

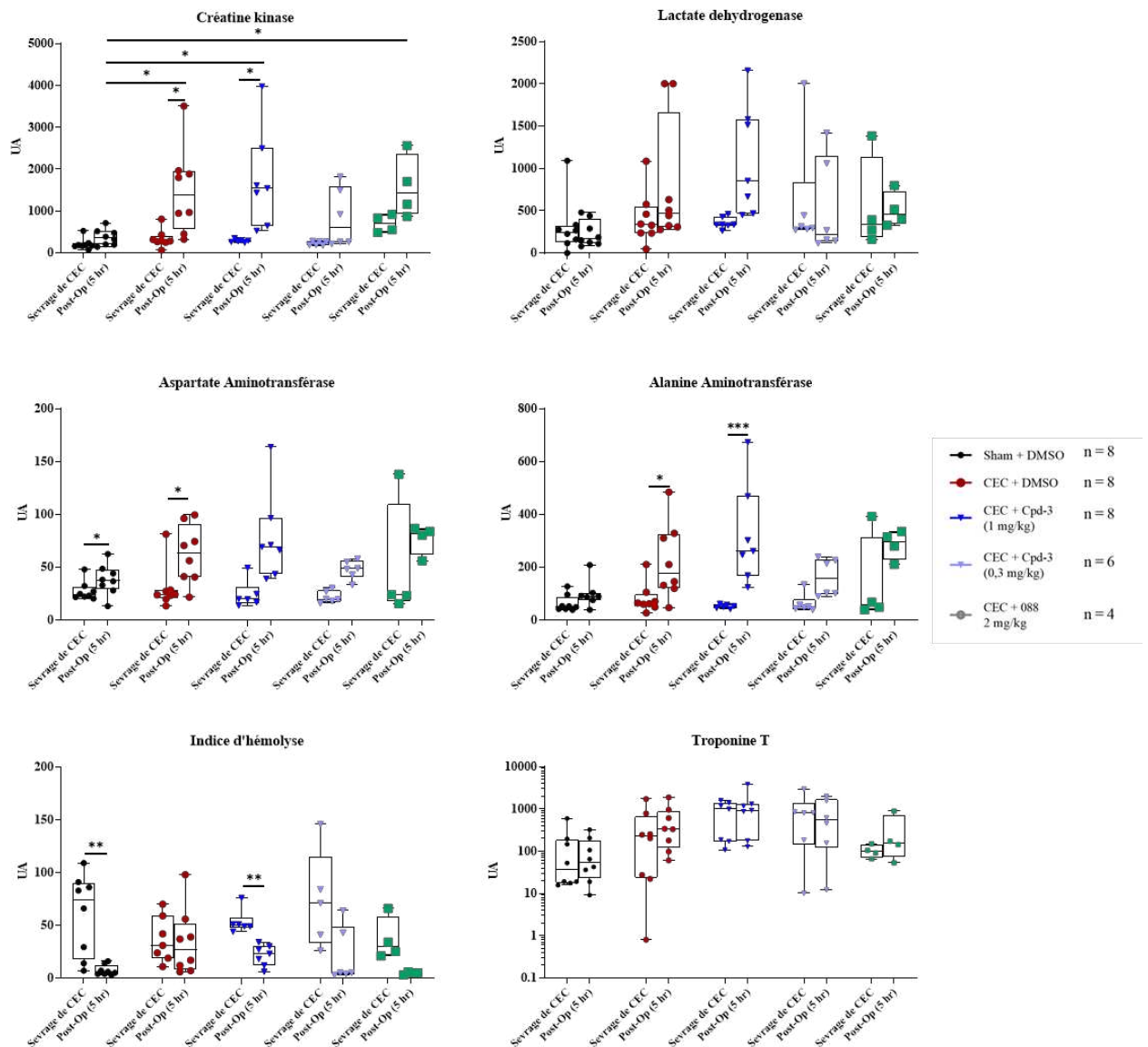


Figure 33 : Mesure de marqueurs plasmatique cardiaque et de stress/dommages tissulaires et hémolyse à partir de sang artériel des rats avec ou sans molécules administré avant la chirurgie
 Le groupe Sham (n=8), le groupe CEC seule (n=8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=8 et 6) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. La mesure plasmatique des marqueurs cardiaque (Troponine T) et de stress/dommages tissulaires (Aspartate aminotransférase, Alanine aminotransférase, lactate déshydrogénase, la créatine kinase) et l'indice d'hémolyse sont déterminés à partir de plasma de rats opérés des groupes Sham ou CEC. Du plasma a été collecté au sevrage de la CEC et 5 heures après l'opération. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests appariés ANOVA à deux voies avec le test de comparaisons multiples de Sidak pour les rats. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.4.3.5 Inflammation sur le modèle de rat

Afin d'évaluer que les traitements pharmacologiques pour moduler l'ISR avaient également un impact sur l'inflammation comme il a déjà été proposé dans la littérature dans d'autres modèles, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques en IL-6 au sevrage de la CEC ainsi qu'à 5 heures en postopératoire (**Figure 34**).

Tout d'abord, nous constatons sans surprise qu'il existe une augmentation significative de la concentration de la cytokine pro inflammatoire IL-6 plasmatique normalisée par la concentration de protéines totales plasmatiques chez les rats ayant subi une circulation extracorporelle comparé aux Sham dès le sevrage de la CEC (Sham : $32,80 \pm 32,01$; CEC : $294,01 \pm 70,14$, $p < 0,05$). Ces niveaux d'IL-6 ne sont pas significativement diminués en postopératoire chez les CEC (post-op (5h) : $147,70 \pm 62,77$).

Les animaux ayant reçu avant l'opération le Cpd-3 montrent une diminution significative de la concentration en IL-6 que ce soit à 1 mg/kg (sevrage : $271,78 \pm 56,28$; Post-op : $21,01 \pm 9,87$, $p < 0,05$) ou à 0,3 mg/kg (sevrage : $144,97 \pm 71,20$; Post-op : $10,38 \pm 5,75$, $p < 0,05$), ce qui est en faveur d'une activité anti-inflammatoire et qui corrobore l'état de santé général de l'animal qui semble amélioré. En revanche, l'administration de l'IFB-088 ne sembla pas favoriser une diminution de la concentration en IL-6.

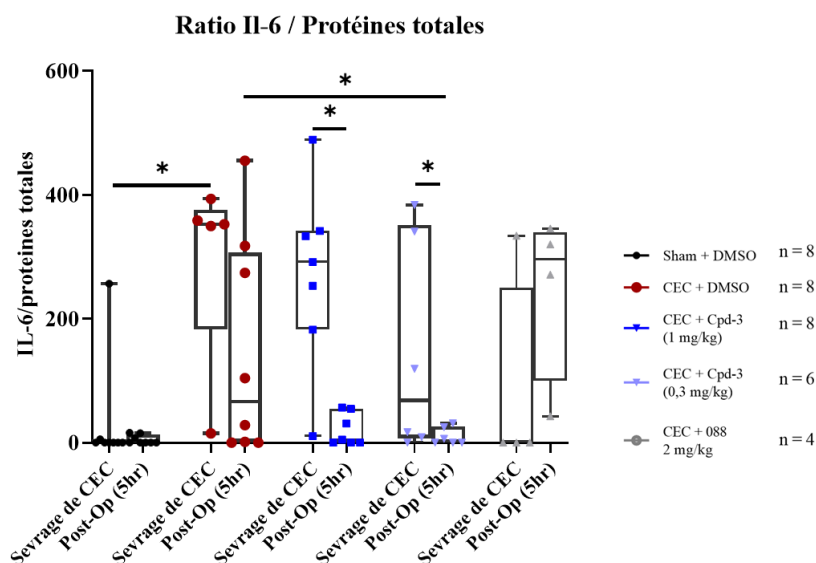


Figure 34 : Dosage de l'interleukine 6 (IL-6) dans le plasma des rats avec ou sans molécules administré avant la chirurgie

Le groupe Sham (n=8), le groupe CEC seule (n=6-8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=6-8) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. La concentration d'IL-6 plasmatique a été déterminé par méthode ELISA à partir de plasma de rats opérés et récupéré au sevrage de la CEC et 5 heures après l'opération. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests appariés ANOVA à deux voies avec le test de comparaisons multiples de Sidak pour les rats. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.4.3.6 Histologie pulmonaire

Afin d'évaluer la fonction pulmonaire sur le modèle de CEC exposé ou non aux molécules, peu de biomarqueurs plasmatiques mesurables existent. Toutefois la description d'une atteinte pulmonaire peut être faite par la mesure de paramètres physiologiques tels que le rapport $\text{FiO}_2 / \text{PaO}_2$ ou la fréquence respiratoire ou encore par les variations de paramètres histologiques tels que la déstructuration des alvéoles ou autres structures pulmonaires, de l'état d'oxydation des protéines, et de l'infiltrat de cellules telles que les neutrophiles.

Dans ce modèle, la variation des paramètres physiologiques ne permet pas la mise en évidence de problème fonctionnel pulmonaire. En revanche, une atteinte histologique ne peut être exclure et est évaluée.

3.4.3.6.1 Coloration des neutrophiles au Naphtol

La coloration par le naphtol des coupes de poumons, ici le lobe gauche, permet de mettre en évidence les structures mais également la présence de neutrophiles.

L'analyse des coupes histologiques ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives dans la structure des alvéoles pulmonaires entre les groupes d'animaux. En revanche, le marquage par le naphtol des neutrophiles permet de mettre en évidence une augmentation, néanmoins non significative, de la présence de neutrophiles chez les rats contrôle ayant subi une circulation extracorporelle comparé au groupe Sham. Cette coloration au naphtol permet de mettre en évidence une diminution significative de l'infiltration pulmonaire de neutrophiles chez les rats traités avec le Cpd-3 à 0,3 mg/kg (CEC : $30,00 \pm 3,64$; Cpd-3 (0,3 mg/kg) : $15,33 \pm 3,96$, $p < 0,05$) et l'IFB-088 (CEC : $30,00 \pm 3,64$; IFB-088 : $12,50 \pm 3,57$, $p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent qu'il existe une diminution d'inflammation pulmonaire et probablement une diminution de l'apparition des dégâts pulmonaire par le traitement avec le Cpd-3 à 0,3mg/kg et l'IFB-088.

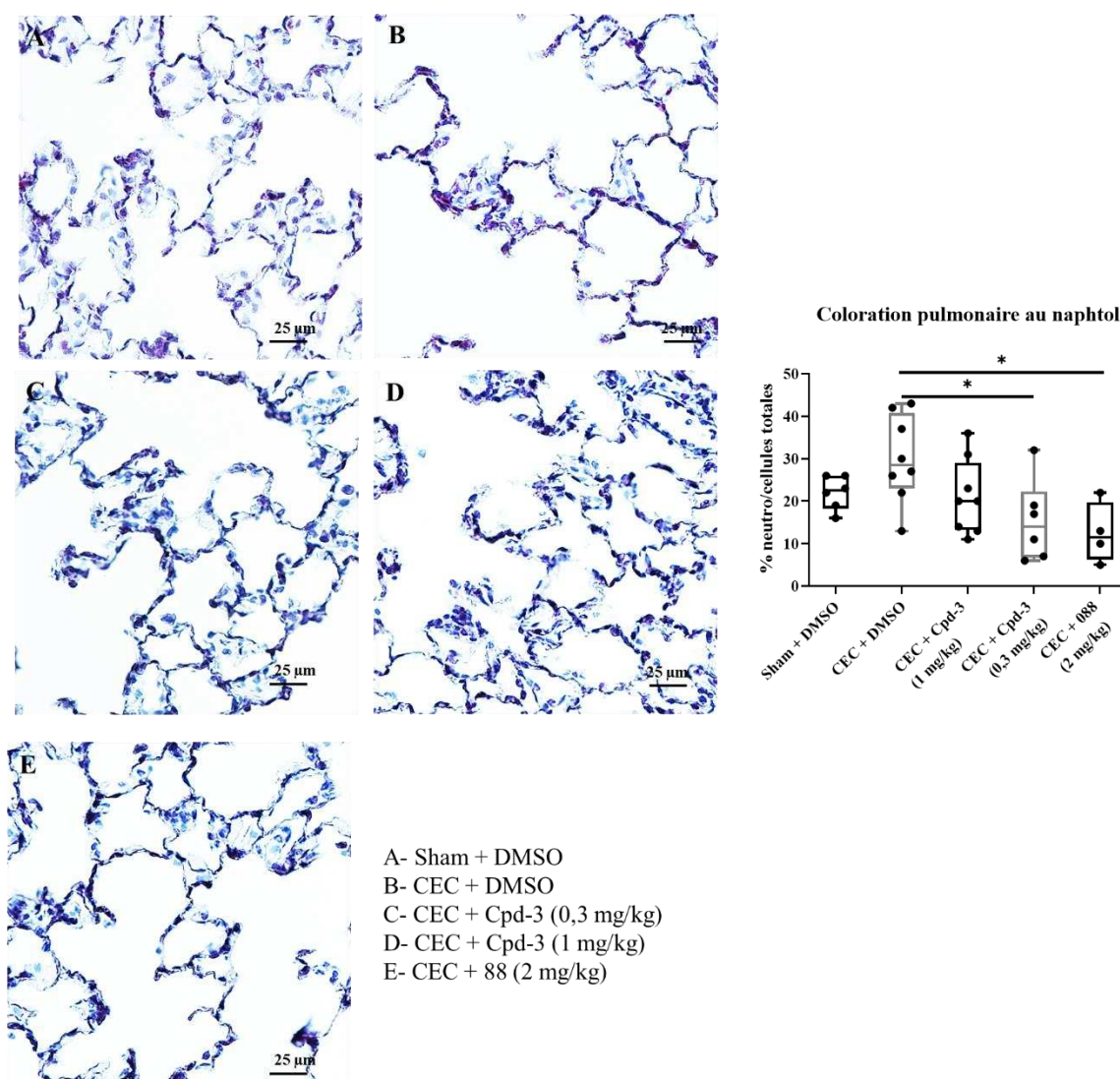


Figure 35 : Coloration au naphthol de coupes des lobes gauches du poumon

Le groupe Sham (n=6), le groupe CEC seule (n=8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=8 et 6) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. Une coloration (Bleu/rose) permet de visualiser au microscope à x200 les neutrophiles sur les coupes du lobe pulmonaire gauche. Les résultats sont exprimés par le pourcentage du nombre de neutrophiles sur le nombre de cellules total dans le champ. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests de Kruskal-Wallis avec le test de comparaison multiples de Dunn's pour les rats. *p<0,05.

3.4.3.6.2 Immunomarquage de la nitrotyrosine

L'immunomarquage par l'anticorps dirigé contre la nitrotyrosine permet de mettre en évidence les protéines nitrosylées à la suite d'un stress oxydatif et de l'inflammation général dans le tissu.

Le groupe Sham présente peu de cellules marquées par de la nitro tyrosine comparé au groupe CEC (Sham : $1,41 \pm 0,31$; CEC : $4,57 \pm 1,00$ %, $p < 0,05$). De manière intéressante, l'administration des molécules permettant la modulation de la voie de l'ISR tend à réduire le marquage des protéines nitrosylées ce qui suggère une diminution de l'inflammation et ou de l'état d'oxydation générale dans le poumon. Ces résultats sont donc en faveur d'une amélioration de la fonction ou de la récupération pulmonaire post opératoire.

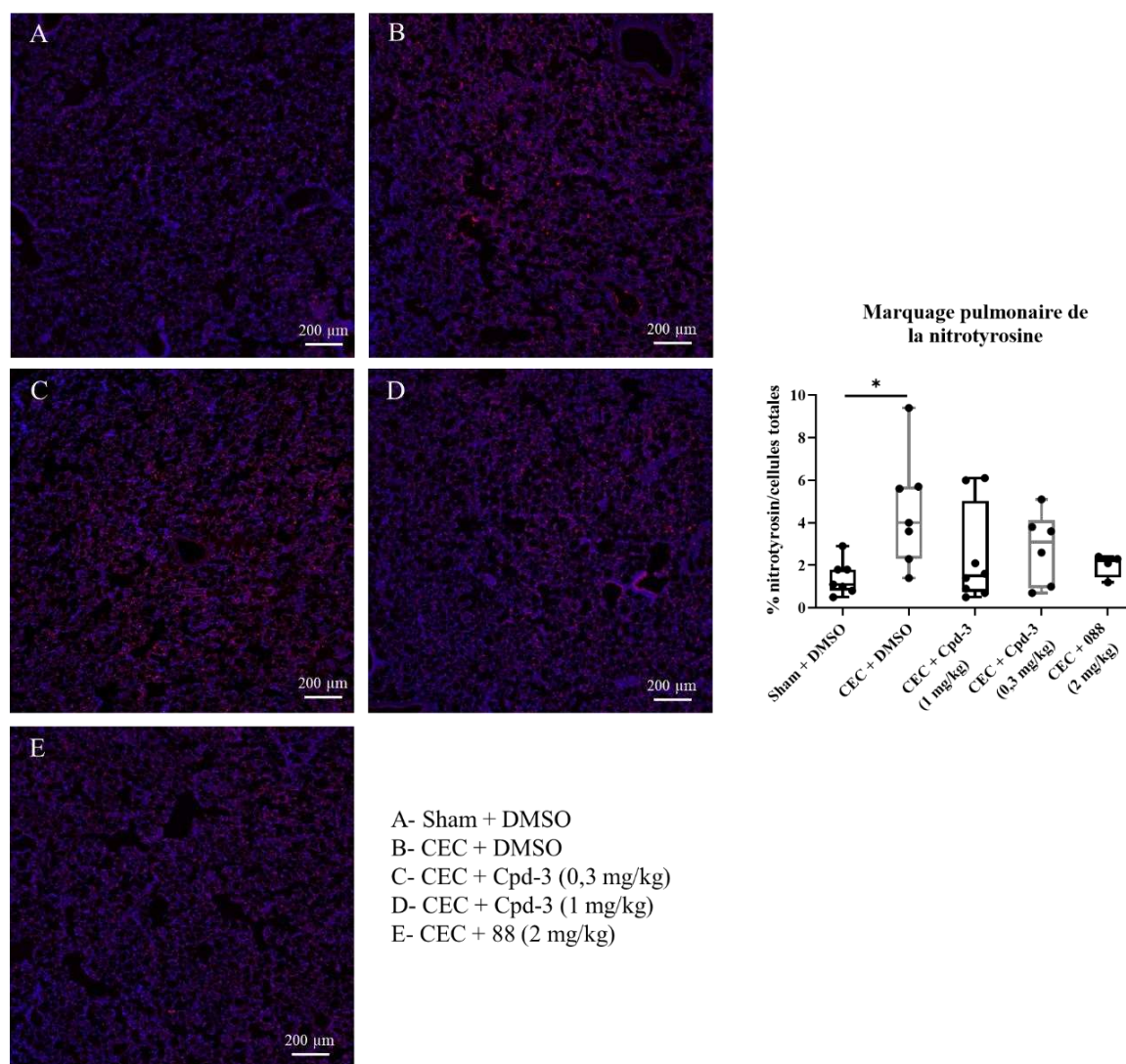


Figure 36 : Immunomarkage de la nitrotyrosine pulmonaire.

Le groupe Sham (n=6), le groupe CEC seule (n=8), le Cpd-3 à 1 ou 0,3 mg/kg (n=8 et 6) et l'IFB-088 (n=4) sont représentés ici. Un immunomarkage avec un anticorps nitrotyrosine (rouge) et au DAPI (Bleu) permet de visualiser au microscope à x200 les coupes du lobe pulmonaire gauche. Les résultats sont exprimés par le pourcentage entre le nombre de cellules marquées à la nitro tyrosine sur le nombre de cellules total dans le champ. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests de Kruskal-Wallis avec le test de comparaison multiples de Dunn's pour les rats. *p<0,05.

4 Discussion et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet de petites molécules d'InFlectis BioScience, permettant de moduler la voix de réponse intégrée au stress, au cours et après une CEC. Cette procédure retrouvée dans la majeure partie des chirurgies cardiaques induit une réponse inflammatoire systémique importante associée à d'autres éléments physiopathologiques, développés lors de l'introduction, qui favorise un état de stress systémique (Al-Fares et al., 2019; Warltier et al., 2002). Différents facteurs, comme le type de chirurgies, les antécédents et paramètres cliniques du patients, les matériaux et le protocole utilisé, sont très fortement corrélés à l'augmentation des conséquences pathologiques possibles et aboutir à des dommages de différents organes qui augmentent la morbi-mortalité des patients (Misoph and Babin-Ebell, 1997). La recherche de nouvelles stratégies permettant la diminution du SRIS permettrait l'amélioration des conditions de chirurgie sous circulation extracorporelle, et pourrait réduire la survenue de dysfonctions multi-organes et améliorer la survie des patients (De Somer, 2013).

Afin d'évaluer l'effet des molécules, l'utilisation d'un modèle pertinent était indispensable. Le développement de ce type de modèle animal constituait le premier objectif de cette thèse. Plusieurs éléments de la mise au point de ce modèle sont à discuter.

4.1 Pertinence du modèle

Le modèle qui a été mis en place durant cette thèse devait répondre à plusieurs critères :

- La capacité à développer une réponse inflammatoire systémique
- La capacité à développer une dysfonction d'un ou de plusieurs organes en réponse à la CEC
- Le modèle suffisamment viable pour permettre le réveil des animaux de façon reproductible et être maintenu en post-opératoire dans des conditions optimales et éthiques

Ce modèle devait également répondre à des critères de pertinence vis à vis de ce qui peut être observé chez l'Homme

La pertinence du modèle a été évaluée sur différents paramètres tels que le type de circuit utilisé, sa composition, les types de traitements pharmacologiques utilisés, le protocole mis en place et son adaptation à l'animal. Mais également sur le plan physiopathologique, cette pertinence a été évaluée par la proximité des réponses face à la CEC entre le modèle et l'humain.

4.1.1 Adaptation de la procédure

Dans cette étude, la taille du circuit de CEC, adapté à la taille et au poids de l'animal, présente un volume mort de 12 mL est remplie avec 8 mL de Ringer Lactate. Ce volume correspondant à environ 30 % de la volémie du rat. La limitation de la taille du circuit, donc du volume mort et du volume de remplissage du circuit permet de limiter directement l'hémodilution et donc le besoin en transfusion et la puissance de la réponse inflammatoire par la limitation de la surface de contact entre le sang et le circuit.

Dans notre cas, après l'amorçage de la circulation extracorporelle, (donc après l'hémodilution par de priming (Ringer lactate) de la tubulure), l'hématocrite n'est pas descendu à des valeurs inférieures à 28 %. Cela qui permettait de pouvoir réaliser un remplissage complémentaire si nécessaire. En fin de procédure, l'hématocrite ne devait pas être en deçà de 25 %. Ce critère, qui doit être géré durant la procédure, a été défini à partir des données de la littérature. S'il n'existe pas encore de consensus sur la valeur optimale d'hématocrite à respecter, de très nombreuses études montrent une corrélation entre des valeurs d'hématocrites en deçà de 20 % et l'apparition d'insuffisances rénales aiguës, d'œdèmes et de la mortalité (Bronson et al., 2013; Hare et al., 2018; Ito et al., 2009; Mehta et al., 2013; Mukherji et al., 2014; Murphy et al., 2009). L'objectif d'hématocrite a pu être aisément respecté dans notre modèle.

La limitation de la taille du circuit permet également la limitation d'une réponse inflammatoire excessive et précoce par la limitation de la surface de contact entre le sang et les éléments du circuit, comme le décrit également chez le rongeur une étude récente comparant des circuits ayant un important volume mort (15 mL) et un plus faible (7 mL) (Fujii et al., 2016).

L'absence de re-concentration de l'hémoglobine au moment du sevrage de la CEC est un point relativement différent dans la gestion de la masse sanguine entre la procédure clinique et ce modèle. En effet, il existe une hémodilution persistante en postopératoire, qui favorise le développement d'une dysfonction multiviscérale, notamment par l'augmentation du risque de formation d'œdème ou de la sollicitation importante des reins pour le maintien de la balance hydrosodée. Il aurait été possible de récupérer le sang contenu dans le circuit en fin de CEC, de le centrifuger afin de pouvoir re-suspendre les hématies dans un liquide physiologique à la concentration souhaitée. Nous avons déterminé que l'action de la centrifugation et de la récupération extra-corporelle du sang favoriserait davantage l'hémolyse, l'inflammation et ne serait pas nécessairement bénéfique. Ce constat est renforcé par les mesures de PaO_2 en postopératoire permettant de valider qu'il n'y a pas de problème de transport en oxygène.

La diminution de l'hématocrite qui a été observée en postopératoire dans les différents groupes, pourrait être dû à une perte sanguine par de faibles saignements observés au niveau des abords chirurgicaux mais également d'une probable hémolyse provenant, pour les groupes CEC, de la faible compatibilité des matériaux utilisés avec le tissu sanguin ou encore du type de pompe utilisée.

Les matériaux composant le circuit ont été choisis pour être au plus proche de ceux utilisés en clinique humaine, que ce soient les matériaux utilisés pour la tubulure, en Tygon (Ippoliti et al., 2019), mais aussi l'oxygénateur. Il était particulièrement important pour ce dernier qu'il soit adapté aux rongeurs et surtout d'ores et déjà validé et utilisé par de précédentes études (Chang et al., 2017; Edinger et al., 2020; Lebreton et al., 2013, 2012). De plus chaque partie du circuit, la tubulure ou les raccords entre chaque partie, ont été choisis afin de minimiser les différence de diamètre interne permettant ainsi de limiter (i) les variations de résistance à l'écoulement du sang, (ii) l'activation de la phase contact, (iii) les risques d'hémolyse et surtout (iv) de limiter les différences de pression pouvant générer des ruptures de circuit (Fujii et al., 2016). Afin d'avoir un contrôle important tant sur les bas débits que sur les hauts débits, l'utilisation d'une pompe occlusive avec un nombre de galets limités (3 galets) a été préférée. Le faible nombre de galets sur cette pompe permet de limiter l'écrasement de la tubulure, et donc les effets traumatiques sur le tissu sanguin mais aussi sur le circuit (Vieira et al., 2012).

Un autre point important à discuter sur ce protocole sont les abords chirurgicaux choisis. En effet, si le monitoring des pressions artérielles a été effectué par la mise en place d'un cathéter fémoral, les abords permettant un drainage veineux et une reperfusion artérielle sont moins fréquents dans la littérature. Nous avons choisi pour ce protocole d'avoir des abords qui sont les plus centraux possibles afin d'avoir accès respectivement à la veine cave et à l'oreillette droite par la veine jugulaire et à la crosse de l'aorte par la carotide gauche. Les raisons pour lesquelles il semblait important de conserver ses abords sont multiples (You et al., 2005). Tout d'abord, il existe une question anatomique : les abords, ainsi que le design du circuit se rapprochent plus d'une circulation extracorporelle tel qu'il est réalisé au bloc opératoire que d'une ECMO périphérique chez l'adulte, même s'il existe la possibilité d'aborder des voies similaires en clinique (Hirao et al., 2018; Jayaraman et al., 2017). De plus, en l'absence de protocole de cardioplogie sur ce modèle, l'abord carotide permet de reperfusionner le sang oxygéné dans le sens de circulation normale imposée par le cœur. Au contraire, si nous avons privilégié la mise en place d'une canule artérielle fémorale, la reperfusion irait à l'encontre du débit cardiaque. Si tel avait été le cas, comme cela peut être vu dans les ECMO-VA où il y a une activité cardiaque chez le patient, nous aurions pu générer un syndrome d'Harlequin en l'absence d'une ventilation suffisante durant la CEC (Contento et al., 2020; Honore et al., 2020). Ce syndrome est défini par la conséquence d'une compétition entre le débit imposé dans l'aorte par le cœur et celui imposé par l'ECMO. Le sang mal ou moins oxygéné provenant du cœur, à la suite du passage au travers des poumons peu fonctionnels se retrouve en compétition avec le sang oxygéné par l'oxygénateur. Il en résulte un gradient caudorostral d'oxygénation (partie haute du corps moins bien oxygénée que la partie basse). L'ischémie cérébrale et cardiaque qui en découle sont fortement délétères pour le patient (Honore et al., 2020). La position de la canule d'admission au plus proche de l'oreillette droite permet une récupération du sang, une décharge cardiaque droite, optimisée. La reperfusion du sang par la crosse de l'aorte permettrait de limiter l'ischémie cardiaque en perfusant correctement les coronaires.

Concernant la fermeture des abords vasculaires, nous avons décidé d'opter pour une ligature terminale des artères fémorales et carotidiennes et de la veine jugulaire après le sevrage de la CEC. La suture vasculaire, envisageable chez le rat (Kao et al., 2019; Szabo et al., 2020), n'est pas apparue comme étant une option intéressante : le temps de mise en place, le matériel requis (microscope, outils de microchirurgie et fils de sutures 10/0 et 11/0 par exemple) et la durée de maintien des animaux après réveil ne justifient pas la mise en place de cette procédure. Les animaux n'ont pas montré de signes de douleurs ou de boiteries durant la période de réveil malgré la ligature de l'artère fémorale. La ligature d'une carotide n'est pas supposée avoir un impact majeur sur la perfusion cérébrale chez le rat : il existe chez les rongeurs un polygone, ou cercle, de Willis complet qui permet d'assurer une très bonne suppléance par la carotide controlatérale ainsi que l'artère basilaire (De Ley et al., 1985; Salford and Siesjö, 1974).

Pour ce qui est de la ventilation, nous avons choisi de rester simple dans la façon de faire avec une ventilation volume et fréquence contrôlée basée sur la littérature (Rocco et al., 2017). Durant la chirurgie, la fréquence de ventilation a été adaptée afin d'avoir des valeurs cliniquement acceptables de PaO_2 (>80 mmHg) et de PaCO_2 (35-50 mmHg). Durant la circulation extracorporelle, la fréquence ventilatoire a été diminuée afin de limiter les atteintes pulmonaires potentiellement dû à la ventilation invasive (Imura et al., 2010).

L'adaptation du protocole d'anesthésie a été importante lors de l'élaboration de ce modèle et est proche de celui utilisé chez l'Homme. L'utilisation d'une perfusion continue de propofol/fentanyl est en effet peu retrouvée dans la littérature en expérimentation animale mais est néanmoins documentée (Hirose et al., 1998; Petersen et al., 1996). La plupart des modèles exploite l'utilisation de vapeurs halogénées (isoflurane, Sévoflurane, Halothane) ou la réinjection de bolus de pentobarbital sodique. Cependant, l'utilisation d'une anesthésie intraveineuse totale a permis de contrôler bien plus précisément la dose administrée aux animaux et d'éviter le risque de surdose ou au contraire d'une couverture insuffisante durant la procédure (Cicero et al., 2018). Si l'exploitation de vapeur halogéné avait été possible durant toute la procédure il existerait cependant un risque trop important d'émanation de ces vapeurs par l'oxygénéateur dans la pièce. Le passage entre isoflurane pour la première partie de l'intervention puis du propofol/fentanyl durant la CEC avant de repasser à l'isoflurane a

montré une bonne stabilité de l'anesthésie et d'analgésie durant la procédure et a facilité le réveil des animaux.

Dans la prise en charge pharmacologique, nous pouvons néanmoins déplorer l'absence de monitoring de la coagulation, par manque de matériel spécifique dans l'unité d'expérimentation animale. Si durant la durée de CEC nous n'avons pas rencontré le problème de coagulation, cette gestion a conduit dans certains cas à une gestion compliquée des saignements péri-opératoires, notamment au niveau des abords chirurgicaux. Nous concluons à *posteriori* que l'administration d'une dose de protamine équivalente à la dose d'héparine a probablement été ici parfois insuffisante et a amené à l'exclusion ou au décès de quelques animaux durant la période d'expérimentation.

Comme évoqué lors de l'introduction, la température est un paramètre qui peut être difficile à maintenir chez les rats durant les chirurgies, et plus particulièrement durant les chirurgies prolongées. Il est néanmoins essentiel de la maintenir afin de limiter l'impact sur la coagulation, la viscosité sanguine, sur la solubilité des gaz dans le sang et éviter des troubles hémodynamiques (Dárdai and Heavner, 1989; Salah et al., 2005). Du fait d'une surface corporelle importante pour la masse de l'animal, il existe une déperdition de chaleur importante, d'autant plus prononcée que la salle d'opération est maintenue à une température constante de 19-20 °C. La stratégie mise en place pour maintenir les rats entre 36°C et 38,5 °C consistait en l'utilisation d'un tapis chauffant contrôlé automatiquement par la mesure de la température rectale mais également de réchauffer le circuit de circulation extracorporelle afin que le sang ne refroidisse pas au point d'induire pas une hypothermie ou une différence trop importante entre la température corporelle et sanguine. Le seuil limite de température (36 °C) a été déterminé à partir des données de la littérature. Il aurait été possible de diminuer la température des animaux tel qu'il l'a déjà été fait dans la littérature afin de limiter les conséquences ischémique possible néanmoins nous avons pris en considération la durée qu'il faudrait pour réchauffer les animaux avant le réveil et le fait que nous voulions un modèle proche de la pratique humaine (Engelman et al., 2015; Salah et al., 2005).

4.1.2 Systèmes de scores

Il existe dans la littérature et en expérimentation animale certains critères qui permettent d'évaluer l'état de santé global des animaux (Harrison et al., 2020). Néanmoins, ces derniers se basent sur des études du comportement tel qu'il est présenté dans le score d'évaluation du comportement dans ce travail. Ces scores rendent comptes uniquement de l'état de stress, de la douleur ou de l'inconfort de l'animal, sans prendre en compte des paramètres physiologique/biologiques permettant d'approcher rapidement la fonction ou l'état de certains organes. Afin de pallier à cela, notre équipe de recherche a déjà proposé des scores adaptés au modèle utilisé sur des modèles de choc septique, (Ferron et al., 2019) à partir des scores préexistants (Ferreira et al., 2001; Vincent et al., 1996) en clinique. Je me suis en particulier inspiré du score SOFA qui est intéressant par sa dimension multifactorielle qui permet de prendre en compte l'état de plusieurs organes (Ferron et al., 2019). Dans cette étude, nous avons à notre tour essayé d'adapter ce score afin de prendre en compte la réponse des différents organes à la CEC en intégrant des paramètres biologiques, biochimique et comportementaux. Si ce score a pu être mis point et raffiné avec l'incrémentation de l'ensemble des animaux, il manque néanmoins une validation par la mise en place d'une cohorte contrôle. Toutefois, ce score nous a aidé dans la discrimination des animaux pour la suite de l'étude.

4.1.3 Validation hémodynamique et implication de la voie de l'ISR

Dans une première étude au courant de la mise au point, impliquant un faible nombre d'animaux (n=3), nous avons vérifié la faisabilité avec le protocole mis en place de maintenir une circulation extracorporelle sur un temps relativement court de 30 minutes. Grâce à cela nous avons validé notre objectif de pression artérielle minimale de 60 à 65 mmHg durant la CEC. Cet objectif a été choisi par rapport aux données de la littérature, même si encore une fois il n'y a pas de consensus permettant d'établir une pression artérielle moyenne idéale à maintenir, qui recommandent le maintien de pression artérielle supérieure à 50 mmHg sans nécessairement atteindre de pression artérielle normale de 80 à 90 mmHg (Charlson et al., 2007; Kandler et al., 2019; Siepe et al., 2011; Vedel et al., 2018).

Sur cette première expérience préliminaire, nous en avons profité pour valider ce montage de la CEC d'un volume mort de 8 mL, par les mesure d'hématocrite à l'amorçage de la circulation extracorporelle ou à la fin 30 minutes dont les valeurs restent aux alentours des 25 %.

Cette série d'animaux, qui ont été utilisés pour la première phase de mise au point du modèle, a été également utiliser pour former une bio collection après le sevrage des 30 minutes de CEC afin d'évaluer si la voie de l'ISR était engagée après une courte durée le sel c'est dans les organes. Nous mettons en évidence par western blot dans le poumon uniquement, malgré l'effectif limité, une activation de la voie de réponse intégrée au stress : par l'augmentation de l'expression des protéines GADD34, qui est dépendante de l'état de phosphorylation de eIF2 α , ici également fortement augmenté. Ce résultat montrant l'activation de la voie de façon précoce ici au niveau pulmonaire et la démonstration récente par Clavier et collaborateur que le niveau d'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress était associé à la genèse le dysfonction d'organes dans la CEC nous conforte dans l'idée que moduler cette voie pourrait être bénéfique (Clavier et al., 2021).

La validation de ces étapes préliminaires a permis la poursuite du projet et la finalisation du modèle tel qu'il était souhaité c'est à dire avec elle cessé durant 60 minutes suivi d'un réveil et d'un maintien de l'animal durant 5h en postopératoire avant les mesures et prélèvements terminaux.

4.1.4 Caractérisation finale du modèle de CEC avec réveil

Tout d'abord, il était important de caractériser correctement le modèle avant de pouvoir tester les effets des molécules. Comme nous l'avons démontré précédemment, il est possible de maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg durant la totalité de la procédure, c'est à dire 1h. De façon intéressante, nous observons, une instabilité hémodynamique objectivée par le remplissage nécessaire et les vasopresseurs nécessaires en cours de CEC chez les animaux ayant subi une circulation extracorporelle, et, en post-opératoire, une hypotension (Buitenwerf et al., 2019). Cela témoigne d'une incapacité des animaux à réguler leur pression artérielle.

Ce phénomène, comme expliqué en introduction, est associé à l'inflammation et une dérégulation des voies de signalisations impliquées dans la vasoréactivité. Cela peut aboutir à la perte de la régulation fine des résistances vasculaires et de la pression artérielle (Shaefi et al., 2018). Il va également être responsable de de dysfonction multi organes ou de la formation d'œdèmes à cause de la mauvaise la répartition du débit sanguin mais également de la potentielle perte de perméabilité de la barrière endothéliale vasculaire (Gorla et al., 2018). L'hypotension observée après le sevrage et jusqu'en post-opératoire est accompagnée d'une augmentation de la concentration de lactate circulant. L'augmentation des lactates est considérée comme un signe de souffrance tissulaire, souvent en réponse à une dysfonction microcirculatoire (Matteucci et al., 2020; Rosenstein et al., 2018). Dans un contexte de soins critiques, de réanimation ou d'états de choc, l'hyperlactatémie peut être reliée aux conditions de perfusions tissulaires et au manque en oxygène disponible pour le tissu mais également à des dysfonctionnement mitochondriaux ou encore à la stimulation par l'action de catécholamines circulantes (Hartmann et al., 2017). L'hyperlactatémie per et postopératoire sous CEC a déjà été démontré comme étant associé à une morbi-mortalité post opératoire chez l'Homme (Matteucci et al., 2020). C'est sur ce premier point que l'autre modèle diverge de la procédure chez l'Homme : le modèle présente une hyperlactatémie qui n'est pas retrouvée dans la majorité des CEC chez l'Homme. C'est un premier point indiquant que notre modèle reproduit probablement un phénotype plus grave.

Le 2e point, déjà évoqué précédemment, est l'absence de re-concentration de l'hémoglobine en fin de procédure qui implique un hémocrite diminué du début de la phase de CEC jusqu'à la fin du protocole expérimental. Ce point participe probablement à l'aggravation du phénotype des rats.

Nous montrons également sur ce modèle un maintien optimal de l'équilibre acido-basique au cours du temps et de la procédure. En ce qui concerne les équilibres électrolytiques, les différences significatives mise en évidence ne sont pas assez importantes pour avoir un impact physiopathologique. Il est toutefois notable que la PaO₂ est très élevée dans les groupes Sham ou CEC (>200 mmHg). Cette hyper oxygénation montre qu'il n'y a pas de problème d'oxygénation que ce soit par la ventilation ou par l'oxygénateur sous CEC. Les données de la littérature sont controversées sur l'influence de l'hyperoxygénation chez le rat dans ces conditions. En effet, certaines études suggèrent que l'hyperoxygénation

favoriserait l'augmentation de stress oxydatif (Fujii et al., 2013; Kang et al., 2018) de l'inflammation (Fujii et al., 2013) ainsi que l'activation de la voie de l'ISR (Konsavage et al., 2012). A l'inverse dans un contexte de réanimation cardio pulmonaire, l'hyperoxygénation semble montrer des effets bénéfiques (Li et al., 2020). Chez l'Homme les conditions hyperoxiques sont souvent limitées pour éviter la surproduction de ROS et d'inflammation.

Les mesures de paramètres biochimiques plasmatiques sur ce modèle de rat, au sevrage de la CEC et à 5h en postopératoire, montrent une augmentation de la créatininémie et de l'urémie post-opératoire. Ces augmentations sont en faveur d'un dysfonctionnement rénal qui semble être confirmé par une oligurie, et ce dès la fin de l'opération chez les rats CEC. L'établissement d'une dysfonction rénale chez le rat pourrait être confirmée par une étude histologique qui est en cours. Nous nous attendons à voir chez les rats une déstructuration des tubules rénaux, voir des glomérules avec des atteintes médullaires (Evans et al., 2018; Tang et al., 2020). Lorsque l'on compare ces résultats à ceux obtenus dans la cohorte de patients, nous observons une même augmentation de la créatininémie sans toutefois observer de différence de concentration plasmatique en urée chez l'Homme, au contraire de chez le rat. Comme précédemment ces résultats peuvent indiquer que notre modèle de rat présente un phénotype plus sévère que celui présenté en clinique.

Il est très intéressant de noter que lorsque l'on compare les paramètres de souffrance tissulaire plasmatiques comme les alanine et aspartate aminotransférases, la créatine kinase la lactate déshydrogénase, nous observons les mêmes variations dans notre modèle de rat et chez l'Homme. De manière non surprenante, la concentration en troponine T, marqueur de souffrance cardiaque, est bien plus augmentée chez l'Homme que chez le rat, ce qui est facilement explicable par le fait qu'aucune intervention sur le cœur n'a été faite chez le rat (lésion tissulaire). Toutefois chez ce dernier, l'augmentation significative des troponines T dans le groupe CEC montre que la CEC a tout de même un impact sur le tissu cardiaque, que ce soit à cause d'une ischémie ou simplement à cause de la procédure sans clampage, sans cardioplégie. De plus, les rats opérés présentaient les mêmes variations que chez l'Homme pour les paramètres suivants, également évalués et non présentés dans ce manuscrit : le cholestérol total, le HDL cholestérol, la bilirubine conjugués et non conjugués et les triglycérides.

Si le modèle mis en place permet de mimer très correctement à la fois la procédure mais également la réponse à la circulation extracorporelle, évalué par des mesures de paramètres biochimiques, électrolytiques, métaboliques et par un monitoring hémodynamique, nous avons voulu vérifier que les voies de signalisation les plus impliqués en réponse à la CEC étaient aussi comparables. Pour cela nous avons effectué une étude de transcriptomique à partir de PBMC isolés du sang de rat et des patients, de la même manière et dans un même temps. Dans les 2 cas, cette analyse montre une implication importante des gènes impliqués dans les voies de régulation de l'inflammation et de la réponse aux agents pathogènes. Les processus biologiques les plus représentés sont la régulation de l'activation et la dégranulation des neutrophiles, leucocytes et granulocytes. Chez le rat, la réponse à la CEC semble bien plus importante encore une fois que chez l'Homme en présentant des gènes variant fortement entre le groupe Sham et CEC, directement au sevrage d'une CEC de 1 heure.

La démonstration d'un effet sur l'inflammation pendant et après une CEC est cohérente avec à celle retrouvé dans la littérature : la caractérisation du transcriptome rénal par une analyse microarray d'un modèle de rat de CEC montre en effet une implication importante de ces voies (Bouma et al., 2013). En revanche, chez l'Homme les variations d'expression des différents transcrits sont étonnamment ténues. En effet, il semble anormal au premier abord d'avoir si peu de variations du transcriptome au cours du temps, c'est à dire de l'induction du patient en début de matinée jusqu'à 5h après le déclampage aortique, en fin de journée et après, en moyenne, 126 minutes passés sous CEC. Cette observation est renforcée par les données de la littérature notamment par l'étude de Liangos et collaborateur qui étudient le transcriptome de sang total dans une chirurgie cardiaque (Liangos et al., 2010). En 2010, ils démontrent la faisabilité de cette approche dès 2 heures post chirurgie. Toutefois, leur étude met en évidence des processus biologiques impliqués similaires à ceux qui semblent ressortir dans notre étude chez l'homme. Pour conclure, l'étude du transcriptome issus des PBMC des patients et du modèle de rat met en évidence de nouvelles grandes similitudes entre les deux, avec probablement une réponse plus importante chez le rat.

Dans l'ensemble, cela indique que le modèle de rat est très fortement comparable à l'Homme et semble pertinent à la fois dans l'adaptation de la procédure ainsi qu'au niveau de la réponse à la circulation extracorporelle. La principale différence réside dans la présentation d'un phénotype plus grave que celui présenté par la majorité des patients. Ce point était également recherché lors de la mise au point. En effet, l'intérêt de ce modèle est de reproduire un phénotype suffisamment sévère pour permettre l'évaluation des effets des molécules et la mise en évidence de potentiels effets bénéfiques. Ce premier objectif de thèse a donc été atteint, permettant l'utilisation de ce modèle afin d'évaluer l'effet des molécules ciblant l'ISR et développé par InFlectis BioScience dans la CEC et sur ses conséquences.

Avant de tester des petites molécules *in vivo*, il a été primordial de valider l'effet anti-inflammatoire décrit dans la littérature de l'activation de l'ISR (Perego et al., 2018, 2017).

4.2 Test des composés modulant la phosphorylation de eIF2 α *in vitro*

L'efficacité des composés a été évaluée sur la réponse inflammatoire générée par des PBMC en culture à la suite d'un stress induit par du LPS. Cette évaluation a eu lieu en 2 parties. Une première où 3 molécules, préalablement sélectionnées par InFlectis BioScience, ont été utilisées en prétraitement sur les PBMC isolés de sang de rat avant exposition au LPS. Les réponses sur l'ISR et sur l'inflammation ont été évaluées par la mesure des niveaux de transcrits par RT-qPCR. La deuxième évaluation s'est portée sur la molécule la plus prometteuse, c'est-à-dire présentant la réponse anti-inflammatoire la plus importante, cette fois sur la mesure de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant.

Comme attendu l'exposition au LPS des PBMC en culture induit en 3 heures une augmentation importante des niveaux d'expression des transcrits des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α et IL-1 β) (Janský et al., 2003). Nous confirmons que les inhibiteurs du complexe PPP1R15A/PP1c ont dans ce contexte une activité anti-inflammatoire qui semble être dépendante de la concentration. De plus, nos résultats suggèrent une augmentation, néanmoins faible, d'expression du transcrit du gène Ppp1r15a codant pour la protéine GADD34 (PPP1R15A), qui est en faveur d'une activation de la voie

de réponse au stress, comme attendu face à l'agression des cellules par le LPS. L'action de ces molécules semblent avoir un effet sur l'expression de Ppp1r15a. Toutefois, l'importance de la variabilité dans ces mesures ne permet pas de conclure et pourrait rendre caduque cette observation. De plus, si la régulation transcriptionnelle de PPP1R15A ne présente pas de modification, sa régulation traductionnelle peut être très importante (Lee et al., 2009), rendant plus difficile encore l'interprétation des seules niveaux de transcrits. Dans ces conditions, sans niveau d'expression protéique, nous ne pouvons que conclure sur l'effet anti-inflammatoire. De plus amples études mécanistiques devront être effectuées afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions de ces molécules dans ce contexte.

L'activité anti-inflammatoire plus importante du Cpd-2 que les autres molécules aux concentrations les plus faibles en a fait un candidat idéal pour l'administration *in vivo*.

4.3 Test des molécules ciblant l'ISR sur le modèle de CEC

L'objectif était ici d'apporter la preuve de concept de l'intérêt de la modulation de l'activité de l'ISR par l'inhibition de la déphosphorylation de eIF2 α dans la CEC.

La validation de critères de sélections ont permis de favoriser l'utilisation d'un pool restreint de molécules pour envisager les tests sur le modèle de CEC :

- Permettent d'inhiber *in vitro* l'activité du complexe PPP1R15A/PP1c, permettant d'observer une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de la forme phosphorylée de eIF2 α (pSer⁵¹-EIF2 α)
- Ne présentent pas d'activité *off target*
- Ne présentent pas de toxicité aux doses envisagées
- Présentent une demi-vie permettant d'avoir une activité théorique couvrant toute la durée de la chirurgie jusqu'au réveil, après injection unique en prés opératoire
- Sont solubles dans le DMSO/Ringer Lactate sans risque de reformation de précipitats

Dans un premier temps, nous avons eu la surprise de mettre en évidence que l'administration avant la chirurgie du Cpd-2 chez 4 animaux semble être à l'origine d'une hypotension et d'un bradycardie significative. Cet effet hémodynamique évoque fortement l'activité agoniste α_2 -adrénergique du Guanabenz, dont ces séries de molécules sont issues (McHugh, 2018). Comme évoqué dans la partie résultat, InFlectis BioScience s'assure l'absence d'activité agoniste α_2 -adrénergique par des essais cellulaires fonctionnels humains pour les molécules synthétisées. Le Cpd-2 ne présentait lors de cet essai aucune activité agoniste α_2 adrénergique, sur l'unique sous type α_2 -adrénergique humain testé. Si cet effet ne semble pas être dépendant d'une interaction médicamenteuse, vérifiée par la suite par l'administration de la molécule à des animaux « vigiles », nous pouvons émettre différentes hypothèses expliquant la différence observée entre l'essai cellulaire et ce qui se passe chez le rat :

- Les sous types de récepteurs α_2 -AR, et leurs répartitions, peuvent présenter des différences significatives entre le rat et l'Homme. Pourtant les activités d'autres agonistes (Bylund, 2007, 2005; Feller and Bylund, 1984), comme la clonidine ou la dexmedetomidine, ne semblent pas être différentes dans certaines indications
- La métabolisation de la molécule aboutit à la formation d'un métabolite présentant une activité α_2 adrénergique

L'administration de cette molécule ne permet pas de montrer d'amélioration de l'état général des rats évalué par le score d'évaluation de la dysfonction multi-organe mis en place. En revanche, le score d'évaluation du comportement et des réflexes est significativement amélioré, ce qui suggère une amélioration des fonctions cérébrales en post opératoire. De plus, l'administration du Cpd-2 a permis de diminuer le besoin en vasopresseur durant la CEC pour maintenir des pressions >65 mmHg, et ce malgré l'hypotension déjà en place. Cela témoigne d'une stabilité hémodynamique certaine que l'on peut attribuer à l'administration de la molécule.

Sans avoir toutefois de confirmation qu'il s'agit effectivement d'une activité *off-target* α_2 -adrénergique plusieurs résultats vont en ce sens. Outre l'effet hémodynamique

évident les résultats dans leur ensemble font penser encore une fois à un possible effet α_2 -adrénergique, tel qu'il peut être décrit dans la littérature : l'administration d'un agoniste α_2 -adrénergique, la dexmedetomidine permettrait l'amélioration de l'état général post-opératoire en :

- réduisant les dysfonction cérébrales et *delirium* post-opératoire chez le rat (Gao et al., 2021) et chez l'Homme (Park et al., 2014)
- réduisant les dommages d'ischémie/reperfusion et le stress du RE cardiaques et rénaux chez l'Homme et le rat (Soh et al., 2020; Tang et al., 2020) et l'enfant (Xie et al., 2021)
- réduisant l'inflammation systémique chez l'enfant (Qiu et al., 2020; Zhou et al., 2019)
- Améliorant la stabilité hémodynamique au cours de la CEC et en réponse au stress chirurgical (Hashemian et al., 2017; Klamt et al., 2010)

L'administration sur des rats vigiles, sans risque d'interactions pharmacologiques, montre en effet que le Cpd-2 suffit à induire cette réponse α_2 -adrénergique like. Les deux autres molécules, l'IFB-088 (molécule ayant passé la phase 1 d'essai clinique et en préparation pour une Phase 2 dans les indications : sclérose latérale amyotrophique et maladie de Charcot Marie Tooth) et le Cpd-3, ne présentant pas d'effets hypotenseurs ou bradycardisant mais anti-inflammatoire *in vitro*, ont été choisi pour poursuivre les tests *in vivo*, en particulier le Cpd-3, particulièrement intéressant pour InFlectis BioScience.

Dans cette partie, l'administration de l'IFB-088 (aussi retrouvé dans la littérature par la dénomination suivante : Sefpin1) a servi de molécule de référence. En effet, la connaissance des caractéristiques pharmacologiques, de ses effets *in vivo*, son mécanisme d'action ainsi que son métabolisme métabolisation est plus complète que pour d'autres dérivés.

L'administration du Cpd-3 à sa dose la plus faible permet de normaliser en en post-opératoire les pressions artérielles moyennes associé en un besoin per-CEC d'une dose moins importante de vasopresseur (Phénylèphrine) suggérant un effet bénéfique non négligeable. En revanche, la dose la plus élevée présente des effets plus variables mais

semble améliorer l'hypotension post opératoire chez les animaux, toujours avec un besoin significativement diminué en Phénylèphrine. Alors que l'IFB-088 semble se comporter de la même façon que le Cpd-3, ces résultats permettent de penser que les effets, direct ou indirect de la modulation de l'état de phosphorylation de eIF2 α permet d'améliorer l'instabilité hémodynamique dans ce modèle. L'hypothèse d'une amélioration des conditions de perfusions semblent être en accord à la fois avec l'amélioration de la pression artérielle, la moindres dépendance aux vasopresseurs et à la lactatémie diminuée en post-opératoire. Ce potentiel effet hémodynamique face à un stress important ne peut empêcher d'évoquer un effet similaire déjà documenté dans une étude portant sur l'hypertension pulmonaire (He et al., 2016) : des rats traités au Salubrial montraient des pressions artérielles pulmonaires, une pression ventriculaire droite et des remodelages cardiaques et vasculaires diminuées, et donc améliorés, après une exposition à une hypoxie chronique.

Les effets directs ou indirects des Cpd-3 et de l'IFB-088 vont dans le sens d'une amélioration de la fonction rénale par la diminution de la créatininémie et possiblement de l'urémie. Ces effets bénéfiques sont également appuyés par une amélioration comportementale qui démontre une atteinte cérébrale limitée chez les rats traités avec le Cpd-3 à 0,3 mg/kg et l'IFB-088. Encore une fois la variabilité de la réponse avec le Cpd-3 à 1 mg/kg ne permet pas de démontrer un effet bénéfique. Pour autant les molécules permettent toutes de diminuer le score de dysfonction multi-organes.

Plus généralement l'atténuation de stress tissulaire général avec les Cpd-3 à 0,3 mg/kg et l'IFB-088 est objectivée par l'absence d'augmentation significative de créatine kinase, des aspartate et alanine aminotransférases. Enfin l'effet de l'administration du Cpd-3, quel que soit la dose a permis de diminuer les concentrations plasmatiques en IL-6 de manière significative en post opératoire confirmant l'effet anti-inflammatoire qui a été observée *in vitro* dans la première partie de l'étude.

Enfin, l'histologie du poumon ne permet pas de conclure définitivement sur la gravité de l'atteinte pulmonaire dans le modèle mais suggère l'apparition des dommages ayant une origine inflammatoire et de dommages associés à un stress oxydant important par l'augmentation du marquage de la nitrotyrosine. L'effet des molécules sur ces atteintes serait plutôt bénéfique mais cette tendance reste à être confirmée. Toutefois la littérature est encore

une fois plutôt en faveur d'un effet protecteur de la potentialisation de la voie de réponse au stress à une agression pulmonaire hypoxique ou inflammatoire (Fujii et al., 2016; He et al., 2016; Konsavage et al., 2012; Rzymiski et al., 2009, p. 4; J. Wang et al., n.d.)

Afin de résumer l'ensemble des résultats, nous pouvons observer une amélioration générale de l'état de santé des animaux traités qui est le reflet d'une amélioration de multiples paramètres tel que : une diminution de l'inflammation, une amélioration de l'expression de biomarqueurs rénaux, hépatiques, une amélioration de la fonction cérébrale, et probablement un effet bénéfique pulmonaire et rénal. Si ces résultats sont très encourageants, cette étude reste encore pour autant à être complétée afin de mieux caractériser à la fois les effets des molécules utilisées, mais également les mécanismes d'action qui permettrait d'expliquer ces effets.

4.4 Perspectives

Ce projet, initié par le début de la collaboration entre l'équipe 2b de l'institut du thorax et InFlectis BioScience, est relativement nouveau. En effet, si l'entreprise a une connaissance importante des effets des molécules que nous avons eu l'occasion de tester, l'étude sur la CEC et sur le SRIS et pour le coup relativement nouveau. Le premier *challenge* a été la création d'un nouveau modèle de rongeur reproduisant un phénotype sévère à la suite d'une CEC et sa validation par une comparaison avec une cohorte. La première perspective qui est en cours et la caractérisation physiopathologique du modèle, notamment par l'exploration histologique des organes décrits comme les plus atteints que sont les poumons et les reins. Parmi les approches en cours de réalisation en histologie, nous priorisons l'investigation tout d'abord structurel par colorations (Hématoxyline-Eosine par exemple), ce qui permettrait par exemple de mettre en évidence au niveau rénal une déstructuration des tubules, des glomérules, une nécrose possible. En parallèle, l'investigation par immunohistochimie permettrait d'observer, comme nous l'avons fait dans le poumon, l'état d'oxydation des protéines avec la nitro tyrosine, ou encore d'évaluer l'impact de la mort cellulaire par des marquages comme la caspase-3, marqueur pro-apoptique. Par ces approches, nous pourrions également évaluer l'effet des molécules sur ces paramètres.

L'impact des molécules utilisés et de l'effet des doses administrées, et de leurs effets sur la fonction et la structure des organes reste à étudier.

Toutefois nous apportons ici la preuve de concept que l'activation de l'ISR avant et pendant une CEC permet l'atténuation de l'expression de biomarqueurs plasmatiques, de l'IL-6 et de l'inflammation et stress oxydatif pulmonaire qui sont en faveur d'améliorations fonctionnels des organes. Nos résultats suggèrent donc d'effets bénéfiques important et intéressant pour une indication clinique pour la chirurgie cardiaque sous CEC associé à une inflammation systémique et une atteinte viscérale.

Une des perspectives les plus importantes serait d'explorer à la fois l'implication de l'ISR avec et sans traitement mais également et surtout d'explorer les mécanismes d'action des molécules dans les organes les plus impacté. En effet, notre étude très préliminaire n'a pas permis, pour le moment l'identification de mécanismes permettant d'expliquer l'impact des molécules, même si les données de la littérature permettent la formulation d'hypothèses.

A partir de la bio collection effectuée en fin de protocole, nous avons pu observer l'état d'activation de l'ISR par la mesure en Western Blot de l'expression relative des protéines GADD34, CHOP, eIF2 α total et de sa forme phosphorylé (figures non représentées ici). Cette approche n'a montré aucune différence entre les animaux et les groupes sur ces expressions protéiques. Ce résultat nous indique probablement que nous ne sommes pas dans la fenêtre d'observation optimale permettant de voir l'activation de l'ISR dans les organes en réponse à la CEC autant qu'en réponse aux molécules. C'est pour cela qu'il serait intéressant de regarder l'expression des protéines impliquées dans l'ISR bien plus tôt, avant la fin de la demi-vie des molécules, tel qu'au sevrage de la CEC. L'autre approche serait de changer le protocole d'administration des molécules. En effet il serait envisageable par la suite de raffiner le temps d'administration des composés : nous pourrions envisager d'ajouter l'injection d'un nouveau bolus de molécule en fin de CEC par exemple ou après le réveil. L'idée pourrait également d'essayer durant toute la durée de l'observation d'avoir un objectif minimal de concentration plasmatique de la molécule testée avec pour objectif de maintenir un ratio des formes pSer⁵¹-eIF2 α / eIF2 α total toujours positif dans les différents organes.

Toutefois il serait intéressant d'utiliser la bio collection mise en place après les tests *in vivo* des molécules afin d'évaluer l'expression de marqueurs de stress documenté pour les différents organes. Nous pouvons penser par exemple à l'évaluation en Western Blot des niveaux d'expression de protéines tel que KIM-1 (*kidney injury molecule*) qui permettrait de mieux caractériser et de définir un état de souffrance du tissu. Nous pouvons également citer en exemple de multiples cibles qu'il serait intéressant de voir, typiquement les protéines impliquées dans la gestion du stress oxydant, du métabolisme mitochondrial, les facteurs impliqués dans les processus de mort cellulaire par exemple.

Afin d'approfondir la caractérisation des effets bénéfiques de l'administration des molécules, il pourrait être intéressant d'évaluer son effet à plus long terme ainsi que sur la mortalité dans le modèle de rat.

Il serait également pertinent afin d'envisager un futur passage en essai clinique de vérifier l'intérêt d'administrer ces différentes molécules sur un modèle plus proche encore de ce qui se passe chez l'Homme, tel que le modèle de porc.

Les molécules ayant montré également un effet intéressant potentiellement bénéfique dans le SRIS associé à la CEC il pourrait être également pertinent d'évaluer l'effet des molécules dans d'autres modèles présentant une inflammation systémique et le syndrome l'accompagnant. Nous pouvons penser assez facilement à des modèles de choc septique, endotoxinique, hémorragique, cardiogénique ou anaphylactique.

5 Conclusions

Le premier objectif atteint durant cette thèse a été la mise en place et la validation du modèle de circulation extracorporelle chez le rat. Ce modèle, bien qu'adapté de la littérature, présente des différences avec celle-ci, ce qui permet d'améliorer sa reproductibilité, sa facilité dans la mise en place en routine, et sa proximité avec la procédure décrite chez l'Homme. L'utilisation d'une cohorte de patients a permis d'avoir un point de comparaison, permettant la validation à la fois de notre approche mais aussi de la pertinence du modèle.

Ce modèle développe en post-opératoire une hypotension associée à des défauts de perfusion qui sont en faveur d'une instabilité hémodynamique et semble présenter l'apparition de dysfonctions rénales, cérébrales, potentiellement pulmonaires. Ce modèle est caractérisé également par une inflammation importante après la procédure. La caractérisation des dommages réels causés aux différents organes doit être plus finement caractérisée.

L'utilisation de ce modèle a permis l'évaluation des effets des molécules proposées par InFlectis BioScience après avoir confirmé que ces dernières présentaient bien *in vitro* une activité anti-inflammatoire par les diminutions des IL-6, IL-1 β , TNF- α . Durant cette étude, nous avons également mis en évidence une activité α_2 -adrénergique non documentée du Cpd-2, qui était la molécule candidate qui semblait la plus indiquée, conduisant à l'arrêt de son évaluation.

Enfin, cette étude suggère fortement que l'utilisation de petites molécules ciblant le complexe GADD34/PP1c permettant de favoriser l'état de phosphorylation de la eIF2 α serait bénéfique pour prévenir les atteintes multi-organes et l'état inflammatoire à la suite d'une circulation extracorporelle. Toutefois, et même si ces résultats sont ponctuellement supportés par des données de la littérature existante, l'ensemble des résultats obtenus doivent être confirmés par l'étude plus approfondi à la fois des effets sur les différents organes mais également des mécanismes conduisant à ces résultats.

Au cours de ces travaux de thèse nous apportons une preuve de concept de l'intérêt de la modulation de l'ISR par de petites molécules inhibitrices de la déphosphorylation de eIF2 α par le complexe GADD34/PP1c de la CEC.

6 Conclusion personnelle

Cette thèse CIFRE réalisée à l'institut du thorax et à InFlectis BioScience a consisté à bien plus que de la recherche scientifique en institut public. Cette collaboration m'a offert l'opportunité d'évoluer à la fois dans le secteur privé et dans la recherche académique. Pendant un peu plus de 3 ans qu'aura duré cette thèse, j'ai eu l'occasion de commencer et de mener un projet de recherche avec une grande autonomie dans deux structures de recherche différentes. J'ai pu au-delà de l'aspect scientifique de la recherche appréhender les différences d'organisation, de budget et d'infrastructure entre la recherche dans une structure privée de petite taille et dans un laboratoire de recherche public. Les points marquants de cette thèse et de l'apport de la collaboration public-privé sont que j'ai pu apprendre des aspects tels que la valorisation, la défense de la propriété intellectuelle, l'importance de former un réseau, interagir et communiquer. Cette collaboration m'a également permis de découvrir les joies de l'encadrement l'étudiant et de l'enseignement. Cela m'a également permis de mieux appréhender le système de la recherche en France. Pour résumer, la liste conséquente de ce qu'a pu m'apprendre cette thèse CIFRE est une somme d'apprentissage d'ordres scientifiques, humaines ou relationnels. S'il reste encore beaucoup à apprendre, cette thèse m'a conforté dans l'envie de continuer en recherche, de cultiver, d'apporter, de transmettre et partager les connaissances mais aussi les valeurs qui m'ont bercé durant ces 4 dernières années.

Références

- Abosamak, N.E.R., Shahin, M.H., 2021. Beta 2 Receptor Agonists/Antagonists, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Adamik, B., Kübler, A., Gozdzik, A., Gozdzik, W., 2017. Prolonged Cardiopulmonary Bypass is a Risk Factor for Intestinal Ischaemic Damage and Endotoxaemia. *Heart Lung Circ.* 26, 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2016.10.012>
- Akhmerov, A., Ramzy, D., 2021. Mechanical Circulatory Support in Right Ventricular Failure. *Interv. Cardiol. Clin.* 10, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.iccl.2020.12.010>
- Al-Fares, A., Pettenuzzo, T., Del Sorbo, L., 2019. Extracorporeal life support and systemic inflammation. *Intensive Care Med.* 7, 46. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0249-y>
- Alhayek, S., Preuss, C.V., 2021. Beta 1 Receptors, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Ali, Z.A., Callaghan, C.J., Lim, E., Ali, A.A., Nouraei, S.A.R., Akthar, A.M., Boyle, J.R., Varty, K., Kharbanda, R.K., Dutka, D.P., Gaunt, M.E., 2007. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 116, 198–205. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.679167>
- Allen, D.G., Xiao, X.H., 2000. Activity of the Na⁺/H⁺ exchanger contributes to cardiac damage following ischaemia and reperfusion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 727–733. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03329.x>
- Almeida, L.F., Tofteng, S.S., Madsen, K., Jensen, B.L., 2020. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 199, 641–656. <https://doi.org/10.1042/CS20190765>
- Anastasiadis, K., Antonitsis, P., Deliopoulos, A., Argiriadou, H., 2021. From less invasive to minimal invasive extracorporeal circulation. *J. Thorac. Dis.* 13, 1909–1921. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-1830>
- Anastasiadis, K., Antonitsis, P., Haidich, A.-B., Argiriadou, H., Deliopoulos, A., Papakonstantinou, C., 2013. Use of minimal extracorporeal circulation improves outcome after heart surgery; a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Cardiol.* 164, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.01.020>
- Arazawa, D., Oh, H.-I., Ye, S.-H., Johnson, C., Woolley, J., Wagner, W., Federspiel, W., 2012. Immobilized Carbonic Anhydrase on Hollow Fiber Membranes Accelerates

- CO(2) Removal from Blood. *J. Membr. Sci.* 404–404, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.02.006>
- Arora, S., Atreya, A.R., Birati, E.Y., Shore, S., 2021. Temporary Mechanical Circulatory Support as a Bridge to Heart Transplant or Durable Left Ventricular Assist Device. *Interv. Cardiol. Clin.* 10, 235–249. <https://doi.org/10.1016/j.iccl.2020.12.011>
- Asmar, R., 2007. [Blood pressure. Regulation and epidemiology. Standard measures and values]. *Nephrol. Ther.* 3, 163–184. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2007.03.008>
- Atkinson, T.M., Ohman, E.M., O'Neill, W.W., Rab, T., Cigarroa, J.E., Interventional Scientific Council of the American College of Cardiology, 2016. A Practical Approach to Mechanical Circulatory Support in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: An Interventional Perspective. *JACC Cardiovasc. Interv.* 9, 871–883. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2016.02.046>
- Axten, J.M., Romeril, S.P., Shu, A., Ralph, J., Medina, J.R., Feng, Y., Li, W.H.H., Grant, S.W., Heerding, D.A., Minthorn, E., Mencken, T., Gaul, N., Goetz, A., Stanley, T., Hassell, A.M., Gampe, R.T., Atkins, C., Kumar, R., 2013. Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 964–968. <https://doi.org/10.1021/ml400228e>
- Bai, Y., Wu, X., Brennan, K.M., Wang, D.S., D'Antonio, M., Moran, J., Svaren, J., Shy, M.E., 2018. Myelin protein zero mutations and the unfolded protein response in Charcot Marie Tooth disease type 1B. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 5, 445–455. <https://doi.org/10.1002/acn3.543>
- Baird, T.D., Wek, R.C., 2012. Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv. Nutr.* 3, 307–321. <https://doi.org/10.3945/an.112.002113>
- Bartlett, R.H., 2005. Extracorporeal life support: history and new directions. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 51, 487–489. <https://doi.org/10.1097/01.mat.0000179141.08834.cb>
- Bella, E.D., Bersano, E., Antonini, G., Borghero, G., Capasso, M., Caponnetto, C., Chiò, A., Corbo, M., Filosto, M., Giannini, F., Spataro, R., Lunetta, C., Mandrioli, J., Messina, S., Monsurrò, M.R., Mora, G., Riva, N., Rizzi, R., Siciliano, G., Silani, V., Simone, I., Sorarù, G., Tugnoli, V., Verriello, L., Volanti, P., Furlan, R., Nolan, J.M., Abgueguen, E., Tramacere, I., Lauria, G., 2021. The unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase 2 trial. *Brain J. Neurol.* <https://doi.org/10.1093/brain/awab167>
- Bompiani, K.M., Lohrmann, J.L., Pitoc, G.A., Frederiksen, J.W., Mackensen, G.B., Sullenger, B.A., 2014. Probing the Coagulation Pathway with Aptamers Identifies Combinations that Synergistically Inhibit Blood Clot Formation. *Chem. Biol.* 21, 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.05.016>

- Bonhomme, F., Fontana, P., 2015. Laboratory Testing of Hemostasis, in: Marcucci, C.E., Schoettker, P. (Eds.), *Perioperative Hemostasis: Coagulation for Anesthesiologists*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 13–24. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55004-1_2
- Borulu, F., Hanedan, M.O., Coşkun, C., Emir, İ., Mataraci, İ., 2020. Investigation of the Effect of Pulsatile and Nonpulsatile Flow on Kidney in Coronary Surgery With NIRS. *Heart Surg. Forum* 23, E401–E406. <https://doi.org/10.1532/hsf.2341>
- Bouma, H.R., Samarska, I.V., Schenk, M., Dahlem, K.K.K., van den Bos, H., Brebenel, I., Duin, M., Houwertjes, M.C., Loeff, B.G., Mungroop, H.E., Struys, M.M.R.F., Epema, A.H., Henning, R.H., 2013. Microarray analysis of gene expression profiles in the rat kidney demonstrates a local inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass. *Eur. J. Anaesthesiol. EJA* 30, 492–500. <https://doi.org/10.1097/EJA.0b013e32835ce530>
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., Yuan, J., 2005. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935–939. <https://doi.org/10.1126/science.1101902>
- Brixius, K., Bloch, W., Pott, C., Napp, A., Krahwinkel, A., Ziskoven, C., Koriller, M., Mehlhorn, U., Hescheler, J., Fleischmann, B., Schwinger, R.H.G., 2004. Mechanisms of beta 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 143, 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705983>
- Bronson, S.L., Riley, J.B., Blessing, J.P., Ereth, M.H., Dearani, J.A., 2013. Prescriptive patient extracorporeal circuit and oxygenator sizing reduces hemodilution and allogeneic blood product transfusion during adult cardiac surgery. *J. Extra. Corpor. Technol.* 45, 167–172.
- Broun, G., Canh, T.-M., 1977. The use of enzymes for oxygenator membranes, in: CHANG, T.M.S. (Ed.), *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* ISBN Volume I = 0-306-34311-8. Plenum Press, pp. 401–413.
- Bruins, P., te Velthuis, H., Yazdanbakhsh, A.P., Jansen, P.G., van Hardevelt, F.W., de Beaumont, E.M., Wildevuur, C.R., Eijssman, L., Trouwborst, A., Hack, C.E., 1997. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 96, 3542–3548. <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.10.3542>
- Brush, M.H., Weiser, D.C., Shenolikar, S., 2003. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1292–1303. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.4.1292-1303.2003>

- Buitenwerf, E., Boekel, M.F., van der Velde, M.I., Voogd, M.F., Kerstens, M.N., Wietasch, G.J.K.G., Scheeren, T.W.L., 2019. The haemodynamic instability score: Development and internal validation of a new rating method of intra-operative haemodynamic instability. *Eur. J. Anaesthesiol. EJA* 36, 290–296. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000941>
- Burwick, N., Aktas, B.H., 2017. The eIF2-alpha kinase HRI: a potential target beyond the red blood cell. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397133>
- Bylund, D.B., 2007. Alpha-2 Adrenoceptors*, in: Enna, S.J., Bylund, D.B. (Eds.), *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, New York, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60195-3>
- Bylund, D.B., 2005. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? *Br. J. Pharmacol.* 144, 159–160. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706060>
- Caccioppo, A., Franchin, L., Grosso, A., Angelini, F., D’Ascenzo, F., Brizzi, M.F., 2019. Ischemia Reperfusion Injury: Mechanisms of Damage/Protection and Novel Strategies for Cardiac Recovery/Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205024>
- Cancian, M., Borella, E., D’Onofrio, A., Gerosa, G., Simioni, P., Campello, E., 2020. Heparin challenge test in patients undergoing cardiac surgery: dealing with heparin allergy. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 31, 165–169. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000883>
- Carrara, M., Sigurdardottir, A., Bertolotti, A., 2017. Decoding the selectivity of eIF2 α holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 708–716. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3443>
- Chang, R.-W., Luo, C.-M., Yu, H.-Y., Chen, Y.-S., Wang, C.-H., 2017. Investigation of the pathophysiology of cardiopulmonary bypass using rodent extracorporeal life support model. *BMC Cardiovasc. Disord.* 17, 123. <https://doi.org/10.1186/s12872-017-0558-6>
- Charlson, M.E., Peterson, J.C., Krieger, K.H., Hartman, G.S., Hollenberg, J.P., Briggs, W.M., Segal, A.Z., Parikh, M., Thomas, S.J., Donahue, R.G., Purcell, M.H., Pirraglia, P.A., Isom, O.W., 2007. Improvement of outcomes after coronary artery bypass II: a randomized trial comparing intraoperative high versus customized mean arterial pressure. *J. Card. Surg.* 22, 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8191.2007.00471.x>
- Charpentier, E., Cornec, M., Dumont, S., Meistermann, D., Bordron, P., David, L., Redon, R., Bonnaud, S., Bihouée, A., 2021. 3’ RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling (preprint). *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1>

- Chen, Y., Kunjamma, R.B., Weiner, M., Chan, J.R., Popko, B., 2021. Prolonging the integrated stress response enhances CNS remyelination in an inflammatory environment. *eLife* 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.65469>
- Chen, Y., Podojil, J.R., Kunjamma, R.B., Jones, J., Weiner, M., Lin, W., Miller, S.D., Popko, B., 2019. Sephin1, which prolongs the integrated stress response, is a promising therapeutic for multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 142, 344–361. <https://doi.org/10.1093/brain/awy322>
- Choy, M.S., Yusoff, P., Lee, I.C., Newton, J.C., Goh, C.W., Page, R., Shenolikar, S., Peti, W., 2015. Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Rep.* 11, 1885–1891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.043>
- Cicero, L., Fazzotta, S., Palumbo, V.D., Cassata, G., Lo Monte, A.I., 2018. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 89, 337–342. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i3.5824>
- Clavier, T., Demailly, Z., Semaille, X., Thill, C., Selim, J., Veber, B., Doguet, F., Richard, V., Besnier, E., Tamion, F., 2021. A Weak Response to Endoplasmic Reticulum Stress Is Associated With Postoperative Organ Failure in Patients Undergoing Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. *Front. Med.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.613518>
- Combes, A., Leprince, P., Luyt, C.-E., Trouillet, J.-L., Chastre, J., 2009. Assistance cardiorespiratoire par extracorporel membrane oxygenation (ECMO). *Réanimation* 18, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2009.05.012>
- Contento, C., Battisti, A., Agrò, B., De Marco, M., Iaiza, A., Pietraforte, L., Pisani, P., Proietti, A., Vitalini, E., Montalto, A., Musumeci, F., 2020. A novel veno-arteriovenous extracorporeal membrane oxygenation with double pump for the treatment of Harlequin syndrome. *Perfusion* 35, 65–72. <https://doi.org/10.1177/0267659120908409>
- Coucha, M., Mohamed, I.N., Elshaer, S.L., Mbata, O., Bartasis, M.L., El-Remessy, A.B., 2017. High fat diet dysregulates microRNA-17-5p and triggers retinal inflammation: Role of endoplasmic-reticulum-stress. *World J. Diabetes* 8, 56–65. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i2.56>
- Cowled, P.A., Leonardos, L., Millard, S.H., Fitridge, R.A., 2001. Apoptotic cell death makes a minor contribution to reperfusion injury in skeletal muscle in the rat. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 21, 28–34. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2000.1209>
- Crespillo-Casado, A., Claes, Z., Choy, M.S., Peti, W., Bollen, M., Ron, D., 2018. A Sephin1-insensitive tripartite holophosphatase dephosphorylates translation initiation factor 2 α . *J. Biol. Chem.* 293, 7766–7776. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002325>

- Cullinan, S.B., Diehl, J.A., 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.018>
- Cunnea, P., Mháille, A.N., McQuaid, S., Farrell, M., McMahon, J., FitzGerald, U., 2011. Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 17, 808–818. <https://doi.org/10.1177/1352458511399114>
- D’Antonio, M., Musner, N., Scapin, C., Ungaro, D., Del Carro, U., Ron, D., Feltri, M.L., Wrabetz, L., 2013. Resetting translational homeostasis restores myelination in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B mice. *J. Exp. Med.* 210, 821–838. <https://doi.org/10.1084/jem.20122005>
- Dárdai, E., Heavner, J.E., 1989. Comparison of respiratory and cardiovascular effects of halothane, isoflurane, and enflurane delivered via the Jackson-Rees breathing system in rats. New anaesthesia model for small animal surgery. *Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe Organ Sect. Exp. Chir. Ges. Chir. DDR* 22, 50–54.
- Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D’Antonio, M., Barry, N., Sigurdardottir, A., Bertolotti, A., 2015. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* 348, 239–242. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4484>
- De Ley, G., Nshimyumuremyi, J.B., Leusen, I., 1985. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: evolution with time. *Stroke* 16, 69–73. <https://doi.org/10.1161/01.str.16.1.69>
- De Somer, F., 2013. End-organ protection in cardiac surgery. *Minerva Anesthesiol.* 79, 285–293.
- Diab, M., Platzer, S., Guenther, A., Sponholz, C., Scherag, A., Lehmann, T., Velichkov, I., Hagel, S., Bauer, M., Brunkhorst, F.M., Doenst, T., 2020. Assessing efficacy of CytoSorb haemoadsorber for prevention of organ dysfunction in cardiac surgery patients with infective endocarditis: REMOVE-protocol for randomised controlled trial. *BMJ Open* 10. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031912>
- Dimarakis, I., 2016. Miniaturized cardiopulmonary bypass in adult cardiac surgery: a clinical update. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 14, 1245–1250. <https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1224645>
- Edinger, F., Schneck, E., Schulte, C., Gehron, J., Mueller, S., Sander, M., Koch, C., 2020. Comparison of the effect of membrane sizes and fibre arrangements of two membrane oxygenators on the inflammatory response, oxygenation and decarboxylation in a rat model of extracorporeal membrane oxygenation. *BMC Cardiovasc. Disord.* 20. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01581-3>
- Ellis, W.C., Schafer, M., Barrett, C.S., Butler, K., Sprowell, A., Twite, M., Buckvold, S., Jone, P.-N., Ing, R.J., 2019. Vascular anatomical considerations and clinical decision

- making during insertion of the Avalon® Elite Dual Lumen single-site veno-venous ECMO cannula in children weighing less than 20 kg. *Perfusion* 34, 267–271. <https://doi.org/10.1177/0267659118815104>
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, A.D., 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245, 1118–1121. <https://doi.org/10.1126/science.2570461>
- Engelman, R., Baker, R.A., Likosky, D.S., Grigore, A., Dickinson, T.A., Shore-Lesserson, L., Hammon, J.W., 2015. The Society of Thoracic Surgeons, The Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and The American Society of ExtraCorporeal Technology: Clinical Practice Guidelines for Cardiopulmonary Bypass--Temperature Management During Cardiopulmonary Bypass. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 29, 1104–1113. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2015.07.011>
- Evans, R.G., Lankadeva, Y.R., Cochrane, A.D., Marino, B., Iguchi, N., Zhu, M.Z.L., Hood, S.G., Smith, J.A., Bellomo, R., Gardiner, B.S., Lee, C.-J., Smith, D.W., May, C.N., 2018. Renal haemodynamics and oxygenation during and after cardiac surgery and cardiopulmonary bypass. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 222. <https://doi.org/10.1111/apha.12995>
- Farook, J.M., Shields, J., Tawfik, A., Markand, S., Sen, T., Smith, S.B., Brann, D., Dhandapani, K.M., Sen, N., 2013. GADD34 induces cell death through inactivation of Akt following traumatic brain injury. *Cell Death Dis.* 4, e754. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.280>
- Feller, D.J., Bylund, D.B., 1984. Comparison of alpha-2 adrenergic receptors and their regulation in rodent and porcine species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 275–282.
- Ferrè, S., Deng, Y., Huen, S.C., Lu, C.Y., Scherer, P.E., Igarashi, P., Moe, O.W., 2019. Renal tubular cell spliced X-box binding protein 1 (Xbp1s) has a unique role in sepsis-induced acute kidney injury and inflammation. *Kidney Int.* 96, 1359–1373. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.06.023>
- Ferreira, F.L., Bota, D.P., Bross, A., Mélot, C., Vincent, J.L., 2001. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 286, 1754–1758. <https://doi.org/10.1001/jama.286.14.1754>
- Ferron, M., Cadiet, J., Persello, A., Prat, V., Denis, M., Erraud, A., Aillerie, V., Mevel, M., Bigot, E., Chatham, J.C., Gauthier, C., Rozec, B., Lauzier, B., 2019. O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock. *Sci. Rep.* 9, 18751. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55381-7>
- Ficial, B., Vasques, F., Zhang, J., Whebell, S., Slattery, M., Lamas, T., Daly, K., Agnew, N., Camporota, L., 2021. Physiological Basis of Extracorporeal Membrane Oxygenation and Extracorporeal Carbon Dioxide Removal in Respiratory Failure. *Membranes* 11. <https://doi.org/10.3390/membranes11030225>

- Fountain, J.H., Lappin, S.L., 2021. Physiology, Renin Angiotensin System, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Fujii, Y., Shirai, M., Takewa, Y., Tatsumi, E., 2016. Cardiopulmonary Bypass with Low- Versus High-Priming Volume: Comparison of Inflammatory Responses in a Rat Model. *ASAIO J.* 62, 286–290. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000347>
- Fujii, Y., Shirai, M., Tsuchimochi, H., Pearson, J.T., Takewa, Y., Tatsumi, E., Taenaka, Y., 2013. Hyperoxic Condition Promotes an Inflammatory Response During Cardiopulmonary Bypass in a Rat Model: Inflammatory Response During Hyperoxic CPB. *Artif. Organs* 37, 1034–1040. <https://doi.org/10.1111/aor.12125>
- Gambardella, G., Staiano, L., Moretti, M.N., De Cegli, R., Fagnocchi, L., Di Tullio, G., Polletti, S., Braccia, C., Armirotti, A., Zippo, A., Ballabio, A., De Matteis, M.A., di Bernardo, D., 2020. GADD34 is a modulator of autophagy during starvation. *Sci. Adv.* 6. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb0205>
- Gao, Z., Li, Z., Deng, R., Liu, Q., Xiao, Q., Han, J., Pu, C., Zhang, Y., 2021. Dexmedetomidine improves postoperative neurocognitive disorder after cardiopulmonary bypass in rats. *Neurol. Res.* 43, 164–172. <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1833154>
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., Le Marec, H., 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 102, 1377–84. <https://doi.org/10.1172/JCI2191>
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H., 1996. Functional β 3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98, 556–562. <https://doi.org/10.1172/JCI118823>
- Ghadge, G.D., Sonobe, Y., Camarena, A., Drigotas, C., Rigo, F., Ling, K.K., Roos, R.P., 2020. Knockdown of GADD34 in neonatal mutant SOD1 mice ameliorates ALS. *Neurobiol. Dis.* 136, 104702. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104702>
- Godignon, M., Costes, F., Sapin, V., Bouvier, D., 2017. A support to biological validation of oxygenation parameters. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 75, 653–663. <https://doi.org/10.1684/abc.2017.1274>
- Gorla, R., Erbel, R., Eagle, K.A., Bossone, E., 2018. Systemic inflammatory response syndromes in the era of interventional cardiology. *Vascul. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.04.003>
- Gorska, M., Popowska, U., Sielicka-Dudzin, A., Kuban-Jankowska, A., Sawczuk, W., Knap, N., Cicero, G., Wozniak, F., 2012. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 2269–2277. <https://doi.org/10.2741/4050>
- Gu, M., Ouyang, C., Lin, W., Zhang, T., Cao, X., Xia, Z., Wang, X., 2014. Phosphatase Holoenzyme PP1/GADD34 Negatively Regulates TLR Response by Inhibiting

- TAK1 Serine 412 Phosphorylation. *J. Immunol.* 192, 2846–2856. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302537>
- Günzinger, R., Wildhirt, S.M., Schad, H., Heimisch, W., Gurdan, M., Mendler, N., Grammer, J., Lange, R., Bauernschmitt, R., 2007. A rat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment by conductance catheter technique. *Basic Res. Cardiol.* 102, 508–517. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0668-x>
- Hajouli, S., Ludhwani, D., 2021. Heart Failure And Ejection Fraction, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Hamilton, W.F., 1960. Frank, Henderson, and Starling. *Am. Heart J.* 59, 803–806. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(60\)90404-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(60)90404-x)
- Hansbro, S.D., Sharpe, D.A., Catchpole, R., Welsh, K.R., Munsch, C.M., McGoldrick, J.P., Kay, P.H., 1999. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: an in vivo comparison of standard roller pumps, nonocclusive roller pumps and centrifugal pumps. *Perfusion* 14, 3–10. <https://doi.org/10.1177/026765919901400102>
- Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R.J., Ron, D., 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α) dephosphorylation in mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1832–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809632106>
- Hare, G.M.T., Han, K., Leshchyshyn, Y., Mistry, N., Kei, T., Dai, S.Y., Tsui, A.K.Y., Pirani, R.A., Honavar, J., Patel, R.P., Yagnik, S., Welker, S.L., Tam, T., Romaschin, A., Connelly, P.W., Beattie, W.S., Mazer, C.D., 2018. Potential biomarkers of tissue hypoxia during acute hemodilutional anemia in cardiac surgery: A prospective study to assess tissue hypoxia as a mechanism of organ injury. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* 65, 901–913. <https://doi.org/10.1007/s12630-018-1140-0>
- Harrison, D.J., Creeth, H.D.J., Tyson, H.R., Boque-Sastre, R., Isles, A.R., Palme, R., Touma, C., John, R.M., 2020. Unified Behavioral Scoring for Preclinical Models. *Front. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00313>
- Hartmann, C., Radermacher, P., Wepler, M., Nußbaum, B., 2017. Non-Hemodynamic Effects of Catecholamines. *Shock Augusta Ga* 48, 390–400. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000879>
- Hashemian, M., Ahmadinejad, M., Mohajerani, S.A., Mirkheshti, A., 2017. Impact of dexmedetomidine on hemodynamic changes during and after coronary artery bypass grafting. *Ann. Card. Anaesth.* 20, 152–157. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_76_16
- He, Y.-Y., Liu, C.-L., Li, X., Li, R.-J., Wang, L.-L., He, K.-L., 2016. Salubrinol attenuates right ventricular hypertrophy and dysfunction in hypoxic pulmonary hypertension of rats. *Vascul. Pharmacol.* 87, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.09.009>

- Hessel, E.A., Groom, R.C., 2020. Guidelines for Conduct of Cardiopulmonary Bypass. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* S1053077020304171. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.04.058>
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., Glimcher, L.H., 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 23, 2294–2306. <https://doi.org/10.1101/gad.1830709>
- Hetzer, R., Javier, M.F. del M., Dandel, M., Loebe, M., Javier Delmo, E.M., 2021. Mechanical circulatory support systems: evolution, the systems and outlook. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 11, 309–322. <https://doi.org/10.21037/cdt-20-283>
- Hirao, S., Masumoto, H., Itonaga, T., Minatoya, K., 2018. A Recovery Cardiopulmonary Bypass Model Without Transfusion or Inotropic Agents in Rats. *J. Vis. Exp.* 56986. <https://doi.org/10.3791/56986>
- Hirose, N., Yoshida, Y., Koide, S., Takada, K., Saigusa, T., Koshikawa, N., 1998. Effects of propofol and fentanyl on extracellular levels of gamma-aminobutyric acid in the rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J. Oral Sci.* 40, 165–170. <https://doi.org/10.2334/josnurd.40.165>
- Honore, P.M., Barreto Gutierrez, L., Kugener, L., Redant, S., Attou, R., Gallerani, A., De Bels, D., 2020. Risk of harlequin syndrome during bi-femoral peripheral VA-ECMO: should we pay more attention to the watershed or try to change the venous cannulation site? *Crit. Care* 24. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03168-y>
- Hoozemans, J.J.M., van Haastert, E.S., Eikelenboom, P., de Vos, R. a. I., Rozemuller, J.M., Scheper, W., 2007. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 707–711. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.043>
- Ibarra, G., Peña, M., Abril, L., Senín, A., Maluquer, C., Clapés, V., Baca, C., Bustamante, G., Sureda, A., Oriol, A., 2021. Dose intensity and treatment duration of bortezomib in transplant-ineligible newly diagnosed multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* <https://doi.org/10.1111/ejh.13643>
- Ilieva, E.V., Ayala, V., Jové, M., Dalfó, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M.J., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otín, M., 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J. Neurol.* 130, 3111–3123. <https://doi.org/10.1093/brain/awm190>
- Imura, H., Ascione, R., Angelini, G.D., 2010. Low-Frequency Mechanical Ventilation During Cardiopulmonary Bypass, in: Gabriel, E.A., Salerno, T. (Eds.), *Principles of Pulmonary Protection in Heart Surgery*. Springer, London, pp. 367–375. https://doi.org/10.1007/978-1-84996-308-4_39

- Infante, T., Costa, D., Napoli, C., 2021. Novel Insights Regarding Nitric Oxide and Cardiovascular Diseases. *Angiology* 72, 411–425. <https://doi.org/10.1177/0003319720979243>
- Ippoliti, F., Piscioneri, F., Sartini, P., Peruzzi, M., Domenico, M.D., Dannhauser, D., Rossi, D., Causa, F., Netti, P.A., Miraldi, F., Greco, E., Marullo, A., Iaccarino, A., Cavarretta, E., Zoccai, G.B., Sciarretta, S., Frati, G., 2019. Comparative spallation performance of silicone versus Tygon extracorporeal circulation tubing. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 29, 685–692. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivz170>
- Isaacs, J., Welsby, I.J., Schroder, J.N., Onwuemene, O.A., 2020. Activated Coagulation Time and Hepcon Protamine Titration Device to Manage Unfractionated Heparin During Cardiopulmonary Bypass in a Hemophilia A Patient on Emicizumab. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.08.058>
- Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., Hara, H., 2009. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol. Dis.* 36, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.08.013>
- Iwawaki, T., Akai, R., Toyoshima, T., Takeda, N., Ishikawa, T., Yamamura, K., 2017. Transgenic mouse model for imaging of ATF4 translational activation-related cellular stress responses in vivo. *Sci. Rep.* 7, 46230. <https://doi.org/10.1038/srep46230>
- Janský, L., Reymanová, P., Kopecký, J., 2003. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol. Res.* 52, 593–598.
- Jayaraman, A.L., Cormican, D., Shah, P., Ramakrishna, H., 2017. Cannulation strategies in adult veno-arterial and veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: Techniques, limitations, and special considerations. *Ann. Card. Anaesth.* 20, S11–S18. <https://doi.org/10.4103/0971-9784.197791>
- Jefferson, H.L., Kent, W.D.T., MacQueen, K.T., Miller, R.J.H., Holloway, D.D., Fatehi Hassanabad, A., 2021. Left ventricular assist devices: A comprehensive review of major clinical trials, devices, and future directions. *J. Card. Surg.* 36, 1480–1491. <https://doi.org/10.1111/jocs.15341>
- Jiang, H.-Q., Ren, M., Jiang, H.-Z., Wang, J., Zhang, J., Yin, X., Wang, S.-Y., Qi, Y., Wang, X.-D., Feng, H.-L., 2014. Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 277, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.047>
- Kandler, K., Nilsson, J.C., Oturai, P., Jensen, M.E., Møller, C.H., Clemmesen, J.O., Arendrup, H.C., Steinbrüchel, D.A., 2019. Higher arterial pressure during

- cardiopulmonary bypass may not reduce the risk of acute kidney injury. *J. Cardiothorac. Surg.* 14, 107. <https://doi.org/10.1186/s13019-019-0929-4>
- Kang, P.T., Chen, C.-L., Lin, P., Zhang, L., Zweier, J.L., Chen, Y.-R., 2018. Mitochondrial complex I in the post-ischemic heart: reperfusion-mediated oxidative injury and protein cysteine sulfonation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 121, 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.07.244>
- Kao, J.-Y., Chen, Y.-R., Chang, S.-S., 2019. A simple and novel technique for training in microvascular suturing in a rat model. *Asian J. Surg.* 42, 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2018.05.005>
- Kats, S., Schönberger, J.P.A.M., Brands, R., Seinen, W., van Oeveren, W., 2011. Endotoxin release in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathophysiology and possible therapeutic strategies. An update. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 39, 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.06.011>
- Kelly, J.L., O’Sullivan, C., O’Riordain, M., O’Riordain, D., Lyons, A., Doherty, J., Mannick, J.A., Rodrick, M.L., 1997. Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann. Surg.* 225, 530–541; discussion 541-543. <https://doi.org/10.1097/00000658-199705000-00010>
- Klamt, J.G., Vicente, W.V. de A., Garcia, L.V., Ferreira, C.A., 2010. Hemodynamic effects of the combination of dexmedetomidine-fentanyl versus midazolam-fentanyl in children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 60, 350–362. [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(10\)70044-1](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(10)70044-1)
- Kojima, K., Bonassar, L.J., Roy, A.K., Mizuno, H., Cortiella, J., Vacanti, C.A., 2003. A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 823–828. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0462com>
- Konsavage, W.M., Zhang, L., Wu, Y., Shenberger, J.S., 2012. Hyperoxia-induced activation of the integrated stress response in the newborn rat lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L27-35. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00174.2011>
- Kumar, G., Dey, S.K., Kundu, S., 2020. Functional implications of vascular endothelium in regulation of endothelial nitric oxide synthesis to control blood pressure and cardiac functions. *Life Sci.* 259, 118377. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118377>
- Lebreton, G., Tamion, F., Bessou, J.-P., Doguet, F., 2012. Cardiopulmonary bypass model in the rat: a new minimal invasive model with a low flow volume. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 14, 642–644. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivr051>
- Lebreton, G., Tamion, F., Coeffier, M., Richard, V., Bubenheim, M., Bessou, J.-P., Doguet, F., 2013. Modulation of mesenteric vasoreactivity and inflammatory response by protein undernutrition in cardiopulmonary bypass. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 29, 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.08.010>

- Lee, Y.-Y., Cevallos, R.C., Jan, E., 2009. An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 α Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284, 6661–6673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806735200>
- Li, J., Wang, J., Shen, Y., Dai, C., Chen, B., Huang, Y., Xu, S., Wu, Y., Li, Y., 2020. Hyperoxygenation With Cardiopulmonary Resuscitation and Targeted Temperature Management Improves Post-Cardiac Arrest Outcomes in Rats. *J. Am. Heart Assoc.* 9, e016730. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016730>
- Liangos, O., Domhan, S., Schwager, C., Zeier, M., Huber, P.E., Addabbo, F., Goligorsky, M.S., Hlatky, L., Jaber, B.L., Abdollahi, A., 2010. Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation. *PloS One* 5, e13658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013658>
- Lincoff, A.M., Mehran, R., Povsic, T.J., Zelenkofske, S.L., Huang, Z., Armstrong, P.W., Steg, P.G., Bode, C., Cohen, M.G., Buller, C., Laanmets, P., Valgimigli, M., Marandi, T., Fridrich, V., Cantor, W.J., Merkely, B., Lopez-Sendon, J., Cornel, J.H., Kasprzak, J.D., Aschermann, M., Guetta, V., Morais, J., Sinnaeve, P.R., Huber, K., Stables, R., Sellers, M.A., Borgman, M., Glenn, L., Levinson, A.I., Lopes, R.D., Hasselblad, V., Becker, R.C., Alexander, J.H., REGULATE-PCI Investigators, 2016. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial. *Lancet Lond. Engl.* 387, 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00515-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00515-2)
- Liu, L., Wise, D.R., Diehl, J.A., Simon, M.C., 2008. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *J. Biol. Chem.* 283, 31153–31162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805056200>
- Lu, Y.-N., Kavianpour, S., Zhang, T., Zhang, X., Nguyen, D., Thombre, R., He, L., Wang, J., 2021. MARK2 phosphorylates eIF2 α in response to proteotoxic stress. *PLoS Biol.* 19, e3001096. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001096>
- Lucke-Wold, B.P., Logsdon, A.F., Turner, R.C., Huber, J.D., Rosen, C.L., 2017. Endoplasmic Reticulum Stress Modulation as a Target for Ameliorating Effects of Blast Induced Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 34, S-62-S-70. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4680>
- Maguire, P.B., Parsons, M.E., Szklanna, P.B., Zdanyte, M., Münzer, P., Chatterjee, M., Wynne, K., Rath, D., Comer, S.P., Hayden, M., Ní Áinle, F., Gawaz, M., 2020. Comparative Platelet Releasate Proteomic Profiling of Acute Coronary Syndrome versus Stable Coronary Artery Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 7, 101. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00101>

- Maia, P.V., Araújo, G.Z. de, Faria, M.D. de, 2006. Thromboelastograph in cardiac surgery: state of the art. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 56, 78–88. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942006000100011>
- Malard, B., Lambert, C., Kellum, J.A., 2018. In vitro comparison of the adsorption of inflammatory mediators by blood purification devices. *Intensive Care Med.* Exp. 6. <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0177-2>
- Malfertheiner, M.V., Broman, L.M., Vercaemst, L., Belliato, M., Aliberti, A., Di Nardo, M., Swol, J., Barrett, N., Pappalardo, F., Bělohávek, J., Taccone, F.S., Millar, J.E., Crawford, L., Lorusso, R., Suen, J.Y., Fraser, J.F., 2020. Ex vivo models for research in extracorporeal membrane oxygenation: a systematic review of the literature. *Perfusion* 35, 38–49. <https://doi.org/10.1177/0267659120907439>
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>
- Matata, B.M., Scawn, N., Morgan, M., Shirley, S., Kemp, I., Richards, S., Lane, S., Wilson, K., Stables, R., Jackson, M., Haycox, A., Mediratta, N., 2015. A Single-Center Randomized Trial of Intraoperative Zero-Balanced Ultrafiltration During Cardiopulmonary Bypass for Patients With Impaired Kidney Function Undergoing Cardiac Surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 29, 1236–1247. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2015.02.020>
- Matteucci, M., Ferrarese, S., Cantore, C., Cappabianca, G., Massimi, G., Mantovani, V., Rossi, M.B., Beghi, C., 2020. Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: risk factors and impact on surgical results with a focus on the long-term outcome. *Perfusion* 35, 756–762. <https://doi.org/10.1177/0267659120907440>
- McDonald, C.I., Fraser, J.F., Coombes, J.S., Fung, Y.L., 2014. Oxidative stress during extracorporeal circulation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 46, 937–943. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt637>
- McDonald, R.H., Taylor, R.R., Cingolani, H.E., 1966. Measurement of myocardial developed tension and its relation to oxygen consumption. *Am. J. Physiol.* 211, 667–673. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1966.211.3.667>
- McGrath, J.C., 2015. Localization of α -adrenoceptors: JR Vane Medal Lecture. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1179–1194. <https://doi.org/10.1111/bph.13008>
- McHugh, J., 2018. Antihypertensive drug has dual effects. *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 184–184. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2018.25>
- McMahon, J.M., McQuaid, S., Reynolds, R., FitzGerald, U.F., 2012. Increased expression of ER stress- and hypoxia-associated molecules in grey matter lesions in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 18, 1437–1447. <https://doi.org/10.1177/1352458512438455>

- McNamara, N., Narroway, H., Williams, M., Brookes, J., Farag, J., Cistulli, D., Bannon, P., Marasco, S., Potapov, E., Loforte, A., 2021. Contemporary outcomes of continuous-flow left ventricular assist devices-a systematic review. *Ann. Cardiothorac. Surg.* 10, 186–208. <https://doi.org/10.21037/acs-2021-cfmcs-35>
- Mehta, R.H., Castelvechio, S., Ballotta, A., Frigiola, A., Bossone, E., Ranucci, M., 2013. Association of gender and lowest hematocrit on cardiopulmonary bypass with acute kidney injury and operative mortality in patients undergoing cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 96, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.03.033>
- Micalizzi, D.S., Ebright, R.Y., Haber, D.A., Maheswaran, S., 2021. Translational Regulation of Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 81, 517–524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2720>
- Min, B.-K., Kang, H.-J., Choi, B.-J., Jeon, Y.H., Cho, J.-Y., Lee, I.-K., Kim, D.W., 2019. Phenylbutyrate Ameliorates High-Fat Diet-Induced Obesity via Brown Adipose Tissue Activation. *Biol. Pharm. Bull.* 42, 1554–1561. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00346>
- Misoph, M., Babin-Ebell, J., 1997. Interindividual variations in cytokine levels following cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels* 12, 119–127.
- Mohan, S., R, P.R.M., Brown, L., Ayyappan, P., G, R.K., 2019. Endoplasmic reticulum stress: A master regulator of metabolic syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 860, 172553. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172553>
- Molina, E.J., Shah, P., Kiernan, M.S., Cornwell, W.K., Copeland, H., Takeda, K., Fernandez, F.G., Badhwar, V., Habib, R.H., Jacobs, J.P., Koehl, D., Kirklin, J.K., Pagani, F.D., Cowger, J.A., 2021. The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2020 Annual Report. *Ann. Thorac. Surg.* 111, 778–792. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2020.12.038>
- Monteverde, T., Muthalagu, N., Port, J., Murphy, D.J., 2015. Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases. *FEBS J.* 282, 4658–4671. <https://doi.org/10.1111/febs.13534>
- Moore, C.E., Omikorede, O., Gomez, E., Willars, G.B., Herbert, T.P., 2011. PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic β -cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 25, 315–326. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0309>
- Mukherji, J., Hood, R.R., Edelstein, S.B., 2014. Overcoming Challenges in the Management of Critical Events During Cardiopulmonary Bypass. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 18, 190–207. <https://doi.org/10.1177/1089253214526646>
- Murphy, G.S., Hessel, E.A., Groom, R.C., 2009. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach. *Anesth. Analg.* 108, 1394–1417. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181875e2e>

- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136. <https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124>
- Mycko, M.P., Papoian, R., Boschert, U., Raine, C.S., Selmaj, K.W., 2004. Microarray gene expression profiling of chronic active and inactive lesions in multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 106, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2004.02.019>
- Naito, N., Ukita, R., Wilbs, J., Wu, K., Lin, X., Carleton, N.M., Roberts, K., Jiang, S., Heinis, C., Cook, K.E., 2021. Combination of polycarboxybetaine coating and factor XII inhibitor reduces clot formation while preserving normal tissue coagulation during extracorporeal life support. *Biomaterials* 272, 120778. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120778>
- Ní Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., Fitzgerald, U., 2013. Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 37. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-37>
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180–1187. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg112>
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P., Boise, L.H., 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907–4916. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3531>
- Oyanagi, K., Yamazaki, M., Takahashi, H., Watabe, K., Wada, M., Komori, T., Morita, T., Mizutani, T., 2008. Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 650–658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00941.x>
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., Gorman, A.M., 2016. The integrated stress response. *EMBO Rep.* 17, 1374–1395. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>
- Park, J.B., Bang, S.H., Chee, H.K., Kim, J.S., Lee, S.A., Shin, J.K., 2014. Efficacy and safety of dexmedetomidine for postoperative delirium in adult cardiac surgery on cardiopulmonary bypass. *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 47, 249–254. <https://doi.org/10.5090/kjtcs.2014.47.3.249>
- Parsons, R.J., McMaster, P.D., 1938. THE EFFECT OF THE PULSE UPON THE FORMATION AND FLOW OF LYMPH. *J. Exp. Med.* 68, 353–376.
- Patterson, J.B., Samuel, C.E., 1995. Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5376–5388. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.10.5376>

- Perego, J., Bourbon, C., Chasson, L., Laprie, C., Spinelli, L., Camosseto, V., Gatti, E., Pierre, P., 2017. Guanabenz Prevents d-Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Liver Damage and Mortality. *Front. Immunol.* 8, 679. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00679>
- Perego, J., Mendes, A., Bourbon, C., Camosseto, V., Combes, A., Liu, H., Manh, T.-P.V., Dalet, A., Chasson, L., Spinelli, L., Bardin, N., Chiche, L., Santos, M.A.S., Gatti, E., Pierre, P., 2018. Guanabenz inhibits TLR9 signaling through a pathway that is independent of eIF2 α dephosphorylation by the GADD34/PP1c complex. *Sci. Signal.* 11, eaam8104. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aam8104>
- Petersen, J.S., Shalmi, M., Christensen, S., Haugan, K., Lomholt, N., 1996. Comparison of the renal effects of six sedating agents in rats. *Physiol. Behav.* 60, 759–765. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(96\)00142-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(96)00142-4)
- Peterson, J.A., Maroney, S.A., Zwifelhofer, W., Wood, J.P., Yan, K., Bercovitz, R.S., Woods, R.K., Mast, A.E., 2018. Heparin-protamine balance after neonatal cardiopulmonary bypass surgery. *J. Thromb. Haemost. JTH* 16, 1973–1983. <https://doi.org/10.1111/jth.14245>
- Peterss, S., Guenther, S., Kellermann, K., Jungwirth, B., Lichtinghagen, R., Haverich, A., Hagl, C., Khaladj, N., 2014. An experimental model of myocardial infarction and controlled reperfusion using a miniaturized cardiopulmonary bypass in rats. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 19, 561–566. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivu187>
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Macia, C., Raczka, F., Sportouch, C., Gahide, G., Finet, G., André-Fouët, X., Revel, D., Kirkorian, G., Monassier, J.-P., Derumeaux, G., Ovize, M., 2008. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 359, 473–481. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071142>
- Pujara, D., Sandoval, E., Simpson, L., Mallidi, H.R., Singh, S.K., 2015. The State of the Art in Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 27, 17–23. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2015.02.004>
- Qiu, Y., Li, C., Li, X., Jia, Y., 2020. Effects of dexmedetomidine on the expression of inflammatory factors in children with congenital heart disease undergoing intraoperative cardiopulmonary bypass: a randomized controlled trial. *Pediatr. Investig.* 4, 23–28. <https://doi.org/10.1002/ped4.12176>
- Reid, D.W., Tay, A.S.L., Sundaram, J.R., Lee, I.C.J., Chen, Q., George, S.E., Nicchitta, C.V., Shenolikar, S., 2016. Complementary Roles of GADD34- and CREP-Containing Eukaryotic Initiation Factor 2 α Phosphatases during the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1868–1880. <https://doi.org/10.1128/MCB.00190-16>
- Rieder, M., Duerschmied, D., Zahn, T., Lang, C., Benk, C., Lothar, A., Biever, P., Bode, C., Wengenmayer, T., Staudacher, D., Supady, A., 2021. Cytokine Adsorption in Severe

- Acute Respiratory Failure Requiring Veno-Venous Extracorporeal Membrane Oxygenation. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 67, 332–338. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001302>
- Roberts, T.R., Choi, J.H., Wendorff, D.S., Harea, G.T., Beely, B.M., Sieck, K.N., Douglass, M.E., Singha, P., Dean, J.B., Handa, H., Batchinsky, A.I., 2021. Tethered Liquid Perfluorocarbon Coating for 72 Hour Heparin-Free Extracorporeal Life Support. *ASAIO J. Publish Ahead of Print*. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001292>
- Roberts, T.R., Garren, M.R.S., Handa, H., Batchinsky, A.I., 2020. Toward an artificial endothelium: Development of blood-compatible surfaces for extracorporeal life support. *J. Trauma Acute Care Surg.* 89, S59–S68. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002700>
- Rocco, I.S., Viceconte, M., Pauletti, H.O., Matos-Garcia, B.C., Marcondi, N.O., Bublit, C., Bolzan, D.W., Moreira, R.S.L., Reis, M.S., Hossne, N.A., Gomes, W.J., Arena, R., Guizilini, S., 2017. Oxygen uptake on-kinetics during six-minute walk test predicts short-term outcomes after off-pump coronary artery bypass surgery. *Disabil. Rehabil.* 1–7. <https://doi.org/10.1080/09638288.2017.1401673>
- Rojas-Rivera, D., Delvaeye, T., Roelandt, R., Nerinckx, W., Augustyns, K., Vandenabeele, P., Bertrand, M.J.M., 2017. When PERK inhibitors turn out to be new potent RIPK1 inhibitors: critical issues on the specificity and use of GSK2606414 and GSK2656157. *Cell Death Differ.* 24, 1100–1110. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.58>
- Rosenstein, P.G., Tennent-Brown, B.S., Hughes, D., 2018. Clinical use of plasma lactate concentration. Part 1: Physiology, pathophysiology, and measurement. *J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex* 2001 28, 85–105. <https://doi.org/10.1111/vec.12708>
- Rzymiski, T., Milani, M., Singleton, D.C., Harris, A.L., 2009. Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3838–3847. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10086>
- Salah, M., Sutton, R., Tsarovsky, G., Djuric, M., 2005. Temperature Inaccuracies During Cardiopulmonary Bypass. *J. Extra. Corpor. Technol.* 37, 38–42.
- Salford, L.G., Siesjö, B.K., 1974. The influence of arterial hypoxia and unilateral carotid artery occlusion upon regional blood flow and metabolism in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 92, 130–141. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1974.tb05729.x>
- Salley, S.O., Song, J.Y., Whittlesey, G.C., Klein, M.D., 1990. Immobilized carbonic anhydrase in a membrane lung for enhanced CO₂ removal. *ASAIO Trans.* 36, M486–490.
- Sangalli, F., Marzorati, C., Rana, N.K., 2014. History of Extracorporeal Life Support, in: Sangalli, F., Patroniti, N., Pesenti, A. (Eds.), *ECMO-Extracorporeal Life Support in*

- Adults. Springer Milan, Milano, pp. 3–10. https://doi.org/10.1007/978-88-470-5427-1_1
- Sarkar, M., Prabhu, V., 2017. Basics of cardiopulmonary bypass. *Indian J. Anaesth.* 61, 760–767. https://doi.org/10.4103/ija.IJA_379_17
- Sasaki, S., 2010. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 346–355. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181d44992>
- Scolletta, S., Franchi, F., Damiani, E., Cennamo, A., Domizi, R., Meola, A., Scorcella, C., Vanoli, D., Münch, C., Adrario, E., Marchetti, L., Taccone, F.S., Donati, A., 2019. Tissue oxygen saturation changes and postoperative complications in cardiac surgery: a prospective observational study. *BMC Anesthesiol.* 19, 229. <https://doi.org/10.1186/s12871-019-0905-5>
- Selim, J., Hamzaoui, M., Boukhalfa, I., Djerada, Z., Chevalier, L., Piton, N., Genty, D., Besnier, E., Clavier, T., Dumesnil, A., Renet, S., Mulder, P., Doguet, F., Tamion, F., Veber, B., Richard, V., Baste, J.-M., 2021. Cardiopulmonary bypass increases endothelial dysfunction after pulmonary ischaemia-reperfusion in an animal model. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 59, 1037–1047. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa412>
- Shaefi, S., Mittel, A., Klick, J., Evans, A., Ivascu, N.S., Gutsche, J., Augoustides, J.G.T., 2018. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures-Pathophysiology and Targeted Therapy. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 32, 1013–1022. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2017.10.032>
- Siepe, M., Pfeiffer, T., Gieringer, A., Zemmann, S., Benk, C., Schlensak, C., Beyersdorf, F., 2011. Increased systemic perfusion pressure during cardiopulmonary bypass is associated with less early postoperative cognitive dysfunction and delirium. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 40, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.11.024>
- Soh, S., Shim, J.-K., Song, J.-W., Bae, J.-C., Kwak, Y.-L., 2020. Effect of dexmedetomidine on acute kidney injury after aortic surgery: a single-centre, placebo-controlled, randomised controlled trial. *Br. J. Anaesth.* <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.12.036>
- Soliman, R., Fouad, E., Belghith, M., Abdelmageed, T., 2016. Conventional hemofiltration during cardiopulmonary bypass increases the serum lactate level in adult cardiac surgery. *Ann. Card. Anaesth.* 19, 45–51. <https://doi.org/10.4103/0971-9784.173019>
- Squicciarro, E., Jiritano, F., Serraino, G.F., Ten Cate, H., Paparella, D., Lorusso, R., 2021. Quantitative and Qualitative Platelet Derangements in Cardiac Surgery and Extracorporeal Life Support. *J. Clin. Med.* 10. <https://doi.org/10.3390/jcm10040615>
- Starling, E.H., Visscher, M.B., 1927. The regulation of the energy output of the heart. *J. Physiol.* 62, 243–261.

- Sun, P., Ji, B., Sun, Y., Zhu, X., Liu, J., Long, C., Zheng, Z., 2013. Effects of retrograde autologous priming on blood transfusion and clinical outcomes in adults: a meta-analysis. *Perfusion* 28, 238–243. <https://doi.org/10.1177/0267659112474861>
- Sun, X., Aimé, P., Dai, D., Ramalingam, N., Crary, J.F., Burke, R.E., Greene, L.A., Levy, O.A., 2018. Guanabenz promotes neuronal survival via enhancement of ATF4 and parkin expression in models of Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 303, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.01.015>
- Szabó, A., Varga, R., Keresztes, M., Vízler, C., Németh, I., Rázga, Z., Boros, M., 2009. Ischemic limb preconditioning downregulates systemic inflammatory activation. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 897–902. <https://doi.org/10.1002/jor.20829>
- Szabo, B., Fazekas, L., Ghanem, S., Godo, Z.A., Madar, J., Apro, A., Nemeth, N., 2020. Biomechanical comparison of microvascular anastomoses prepared by various suturing techniques. *Injury* 51, 2866–2873. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.02.104>
- Takatani, S., Sakamoto, T., 2000. Mechanical circulatory support devices for bridge to heart transplantation, bridge to recovery, or destination therapy. *J. Artif. Organs* 3, 75–84. <https://doi.org/10.1007/BF02479969>
- Tang, C., Hu, Y., Gao, J., Jiang, J., Shi, S., Wang, J., Geng, Q., Liang, X., Chai, X., 2020. Dexmedetomidine pretreatment attenuates myocardial ischemia reperfusion induced acute kidney injury and endoplasmic reticulum stress in human and rat. *Life Sci.* 257, 118004. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118004>
- Thibault, H., Piot, C., Staat, P., Bontemps, L., Sportouch, C., Rioufol, G., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Aupetit, J.-F., Finet, G., André-Fouët, X., Macia, J.C., Raczka, F., Rossi, R., Itti, R., Kirkorian, G., Derumeaux, G., Ovize, M., 2008. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117, 1037–1044. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729780>
- Trappanese, D.M., Liu, Y., McCormick, R.C., Cannavo, A., Nanayakkara, G., Baskharoun, M.M., Jarrett, H., Woitek, F.J., Tillson, D.M., Dillon, A.R., Recchia, F.A., Balligand, J.-L., Houser, S.R., Koch, W.J., Dell'Italia, L.J., Tsai, E.J., 2015. Chronic β 1-adrenergic blockade enhances myocardial β 3-adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β 1-blocker therapy. *Basic Res. Cardiol.* 110, 456. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0456-3>
- Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D., Bertolotti, A., 2011. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 332, 91–94. <https://doi.org/10.1126/science.1201396>
- Uppala, J.K., Gani, A.R., Ramaiah, K.V.A., 2017. Chemical chaperone, TUDCA unlike PBA, mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress

- induced HepG2 cell death. *Sci. Rep.* 7, 3831. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03940-1>
- Usman, A., Gandhi, J., Gupta, G., 2021. Physiology, Bowditch Effect, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Van Aelbrouck, C., Englberger, L., Faraoni, D., 2012. Review of the fibrinolytic system: comparison of different antifibrinolytics used during cardiopulmonary bypass. *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* 7, 175–179. <https://doi.org/10.2174/157489012803832793>
- Vedel, A.G., Holmgaard, F., Rasmussen, L.S., Langkilde, A., Paulson, O.B., Lange, T., Thomsen, C., Olsen, P.S., Ravn, H.B., Nilsson, J.C., 2018. High-Target Versus Low-Target Blood Pressure Management During Cardiopulmonary Bypass to Prevent Cerebral Injury in Cardiac Surgery Patients: A Randomized Controlled Trial. *Circulation* 137, 1770–1780. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030308>
- Vieira, F.U., Costa, E.T., Vieira, R.W., Antunes, N., Petrucci, O., de Oliveira, P.P., 2012. The effect on hemolysis of the raceway profile of roller pumps used in cardiopulmonary bypass. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 58, 40–45. <https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31820a132c>
- Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., Thijs, L.G., 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22. <https://doi.org/10.1007/BF01709751>
- Wang, J., Lu, L., Chen, S., Xie, J., Lu, S., Zhou, Y., Jiang, H., n.d. PERK Overexpression-Mediated Nrf2/HO-1 Pathway Alleviates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury in Neonatal Murine Cardiomyocytes via Improving Endoplasmic Reticulum Stress. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2020/6458060>
- Wang, L., Popko, B., Tixier, E., Roos, R.P., 2014. Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 71, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.010>
- Wang, S., Force, M., Kunselman, A.R., Palanzo, D., Brehm, C., Ündar, A., 2019. Hemodynamic Evaluation of Avalon Elite Bi-Caval Dual Lumen Cannulas and Femoral Arterial Cannulas. *Artif. Organs* 43, 41–53. <https://doi.org/10.1111/aor.13318>
- Wang, Y., Li, X., Shen, Y., Lyu, J., Sheng, H., Paschen, W., Yang, W., n.d. PERK (Protein Kinase RNA-Like ER Kinase) Branch of the Unfolded Protein Response Confers Neuroprotection in Ischemic Stroke by Suppressing Protein Synthesis. *Stroke.* <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029071>

- Warltier, D.C., Laffey, J.G., Boylan, J.F., Cheng, D.C.H., 2002. The Systemic Inflammatory Response to Cardiac Surgery: Implications for the Anesthesiologist. *Anesthesiology* 97, 215–252. <https://doi.org/10.1097/00000542-200207000-00030>
- Wermuth, C.G., 2006. Selective optimization of side activities: the SOSA approach. *Drug Discov. Today* 11, 160–164. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03686-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03686-X)
- Woo, A.Y., Xiao, R.R., 2012. beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin* 33.
- Wu, J., Wu, Y., Lian, X., 2020. Targeted inhibition of GRP78 by HA15 promotes apoptosis of lung cancer cells accompanied by ER stress and autophagy. *Biol. Open* 9. <https://doi.org/10.1242/bio.053298>
- Xia, X., Lei, L., Qin, W., Wang, L., Zhang, G., Hu, J., 2018. GCN2 controls the cellular checkpoint: potential target for regulating inflammation. *Cell Death Discov.* 4, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41420-017-0022-5>
- Xie, Y., Jiang, W., Cao, J., Xie, H., 2021. Dexmedetomidine attenuates acute kidney injury in children undergoing congenital heart surgery with cardiopulmonary bypass by inhibiting the TLR3/NF-κB signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* 13, 2763–2773.
- Xu, B., Qin, Y., Li, D., Cai, N., Wu, J., Jiang, L., Jie, L., Zhou, Z., Xu, J., Wang, H., 2020. Inhibition of PDE4 protects neurons against oxygen-glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress through activation of the Nrf-2/HO-1 pathway. *Redox Biol.* 28, 101342. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101342>
- You, X.-M., Nasrallah, F., Darling, E., Robins, M., Nieman, G., Searles, B., 2005. Rat Cardiopulmonary Bypass Model: Application of a Miniature Extracorporeal Circuit Composed of Asanguinous Prime. *J. Extra. Corpor. Technol.* 37, 60–65.
- Zakkar, M., Ascione, R., James, A.F., Angelini, G.D., Suleiman, M.S., 2015. Inflammation, oxidative stress and postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery. *Pharmacol. Ther.* 154, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.009>
- Zanaboni, D., Min, J., Seshadri, R., Gaynor, J.W., Dreher, M., Blinder, J.J., 2021. Higher total ultrafiltration volume during cardiopulmonary bypass-assisted infant cardiac surgery is associated with acute kidney injury and fluid overload. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* <https://doi.org/10.1007/s00467-021-04976-2>
- Zhao, G., Kang, J., Xu, G., Wei, J., Wang, X., Jing, X., Zhang, L., Yang, A., Wang, K., Wang, J., Wang, L., Hou, J., Liu, Q., Jiao, K., Gao, B., 2020. Tunicamycin promotes metastasis through upregulating endoplasmic reticulum stress induced GRP78 expression in thyroid carcinoma. *Cell Biosci.* 10, 115. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00478-0>
- Zhou, H., Zhou, D., Lu, J., Wu, C., Zhu, Z., 2019. Effects of Pre-Cardiopulmonary Bypass Administration of Dexmedetomidine on Cardiac Injuries and the Inflammatory Response in Valve Replacement Surgery With a Sevoflurane Postconditioning

Protocol: A Pilot Study. J. Cardiovasc. Pharmacol. 74, 91–97.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000698>

Publications



β_1 -Adrenergic cardiac contractility is increased during early endotoxemic shock: Involvement of cyclooxygenases

David Roul^{a,1}, Bertrand Rozec^{b,*,1}, Marine Ferron^{a,2}, Mortéza Erfanian^a, Antoine Persello^a, Leslie Audigane^a, Amandine Grabherr^a, Angélique Erraud^a, Nolwenn Merlet^{a,2}, Damien Guijarro^b, Ikunobu Muramatsu^c, Benjamin Lauzier^a, Chantal Gauthier^a

^a l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

^b l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

^c School of Medicine, University of Fukui, Fukui, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Endocardial endothelium
Beta-adrenergic receptor
Vascular
Rat
Papillary muscle
LPS

ABSTRACT

Aims: Endothelial dysfunction is one of the earliest symptoms in septic patients and plays an important role in the cardiovascular alterations. However, the endothelial mechanisms involved in the impaired sympathetic regulation of the cardiovascular system are not clear. This study aimed to determine the role of the endocardial endothelium (EE) in the cardiac β -adrenergic (β -AR) remodeling at the early phase of endotoxemic shock.

Main methods: Rats received either lipopolysaccharide (LPS) or saline (control) intravenously. Three hours later, β -AR cardiac contractility was evaluated on papillary muscles with or without a functional EE.

Key findings: Isoproterenol-induced contractility was strongly increased in papillary muscles from LPS rats. A similar increase was observed with a β_1 -AR stimulation, whereas β_2 -AR and β_3 -AR produced similar contractility in control and LPS treatments. The removal of the EE did not modify β_1 -AR-induced contractility in controls, whereas it abolished the increased β_1 -AR response in LPS-treated muscles. In LPS-treated papillary muscle, the increased β_1 -AR-induced contractility was not modified by pretreatment with a NOS inhibitor or an endothelin receptor antagonist. Conversely, the increased β_1 -AR-induced contractility was abolished by indomethacin, a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, as well as by selective inhibitors of COX1 and COX2. An early treatment with indomethacin improved the survival of LPS rat.

Significance: Our results suggest that the EE is involved in the increased cardiac β_1 -AR contractility in the early phase of endotoxemic shock. This effect is mediated through the activation of COX1 and COX2 and suggests these may be novel putative therapeutic targets during endotoxemic shock.

1. Introduction

Septic shock is a leading cause of death with an increasing incidence worldwide [1,2]. Guidelines from the Surviving Sepsis Campaign stated that “similar to polytrauma, acute myocardial infarction or stroke, the speed and appropriateness of therapy administered in the initial hours after severe sepsis develops are likely to influence outcome” [3]. Unfortunately, most studies aiming to identify new relevant therapeutic targets have not investigated the initial stage of this syndrome.

The initial hours of septic shock are mainly characterized by an important and expanded endothelial dysfunction [4]. This endothelial dysfunction is clearly established in vessels where it is involved in the

significant hypotension and multi-organ failure syndrome observed in septic shock [5,6]. In the septic heart, only a few studies have demonstrated that endothelial dysfunction regulates cardiac function through an increased production of nitric oxide (NO), endothelin and prostaglandins [7–10]. Interestingly, these mediators are not only released by the vascular endothelium but also by the endocardial endothelium [7–9].

Besides endothelial dysfunction, early septic shock is also characterized by increased circulating catecholamine concentrations in the plasma of patients leading to a sympathetic overstimulation [11,12]. Such a phenomenon has already been described in the early stage of heart failure where it induced a remodeling of the β -adrenergic receptor

* Corresponding author at: 8 quai Moncousu, 44000 Nantes, France.

E-mail address: bertrand.rozec@chu-nantes.fr (B. Rozec).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

² Present address: Montreal Heart Institute, Montreal, H1T 1C8 Québec, Canada.

(β -AR) [13]. The three β -AR subtypes, β_1 -, β_2 - and β_3 -AR, are expressed in the heart, with the first two inducing a positive inotropic effect and the last inducing a negative inotropic effect [14].

β_1 -AR is down-regulated in septic mice [15] whereas other studies in rats suggest an externalization of β_1 -AR during early sepsis [16], and its inhibition through the use of β -blockers like atenolol or esmolol produces an improvement in cardiac and vascular functions [17–19]. In parallel, a recruitment of β_2 -AR was observed in hearts from acute endotoxemic rats [20], and an up-regulation of β_3 -AR was reported in autopsied hearts from patients having died from septic shock [21].

Given the potential dysfunction of the endocardial endothelium and the probable alterations of cardiac β -AR in the initial stage of septic shock, we hypothesized that endocardial endothelium dysfunction observed in septic shock could be due to an alteration of the β -AR pathway. In this study, we used a well-known and reproducible rat model of sepsis (endotoxemic shock), and investigated cardiac β -AR remodeling of papillary muscles devoid of endothelium to assess the possible involvement of the endocardial endothelium in this remodeling process. Endothelial modulation focused on assessing the three previously described mediators; NO, endothelin and the prostaglandins.

2. Methods

2.1. Animals

Twelve-week-old male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest St, France) were housed under standard conditions of temperature (21–24 °C), humidity (40–60%) and 12 h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. The experiments were performed in compliance with the 2010 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institute of Health (CEEA-2012-231).

2.2. Endotoxemic rat model

Endotoxemia was induced by intra-venous injection of 5 mg·kg⁻¹ of purified *Escherichia coli* LPS derived from *E. coli* O111:B4 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) as previously described [22].

2.3. Echocardiographic measurements

Three hours after LPS or saline injection, animals were anesthetized with 2% volume of isoflurane at 1 L·min⁻¹ O₂ flow to limit hemodynamic repercussion. Transthoracic echocardiography was performed using an ultrasound system VIVID7 (GE Healthcare, Horton, Norway) equipped with a 10 MHz sectorial probe as previously described [23]. Measurements were made on five cardiac cycles and averaged for each data value.

2.4. Hemodynamic measurements

After LPS or saline injection, anesthesia was maintained on spontaneously breathing rats using an inhalational. The right carotid artery was isolated, ligated at the proximal region and a 2F microtip pressure catheter inserted (Millar instruments Inc., Houston, Texas). Pressure and heart rate were continuously recorded during 3 h after LPS or saline injection using an A/D converter (EMKA Technologies, Paris, France) and stored and displayed on a computer by the IOX1.5.7 Software System (EMKA Technologies). Animals were sacrificed by pentobarbital overdose.

2.5. Tissue segment binding experiments

Tissue segment binding experiments were performed as previously described [23]. Briefly, the isolated left ventricle was cut into small pieces under a microscope. About 30 pieces were prepared for each rat.

Each piece was incubated at 4 °C in 1 mL of Krebs incubation buffer (Sigma) with [3H]-CGP-12177 (a high affinity antagonist of both β_1 and β_2 -AR and partial β_1 -AR agonist) for 12 h.

In the saturation binding experiments, 50 pM–20 nM [3H]-CGP-12177 was used in the absence or presence of 1 μ M propranolol (a non-selective β -AR antagonist) to define nonspecific binding. Competition binding experiments were conducted using 300 pM of [3H]-CGP-12177 and 1 pM–10 μ M of ICI-89,406 (a β_1 -AR antagonist) in the absence or presence of 1 μ M propranolol to define nonspecific binding. The pieces were then blotted and solubilized in 1 mL of 0.3 M NaOH (Sigma) to estimate the radioactivity and protein content. The specific binding was determined by subtracting the radioactivity bound per mg protein in the presence of propranolol from total radioactivity bound per mg protein. Experiments were performed in duplicate.

Radioactivity was counted using a liquid scintillation counter (LC-3500, Aloka Co Ltd, Tokyo, Japan) using water-miscible scintillation fluid (ULTIMA GOLDTM, Packard Bioscience, Groningen, Netherlands). The protein content of tissue segments in each tube was measured using the Bradford method using BSA as a standard.

2.6. Papillary muscle contractility measurement

Papillary muscles from the left ventricle were harvested and treated with Triton-X 100 to remove the endocardial endothelium (EE–) as previously described [14,24]. Untreated muscles (EE+) served as controls. Papillary muscles were then perfused at a flow rate of 5 mL/min with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Tyrode's solution (37 ± 0.5 °C) composed as follows (in mmol/L): 116 NaCl, 5 KCl, 2.7 CaCl₂, 1.1 MgCl₂, 0.35 NaH₂PO₄, 27 NaHCO₃, 5 glucose, 5 pyruvic acid sodium salt, 0.15 fumaric acid and 5 L-glutamic acid. Papillary muscles were subjected to field stimulation at a frequency of 1 Hz using square-wave pulses of 1 to 2 ms duration, and amplitude was twice the diastolic threshold. Mechanical tension was recorded using a mechanoelectric force transducer Akers AE 801 (Sensonor, Horton, Norway). After a 60 min equilibration period, papillary muscles were stretched stepwise (10 μ m increments) to a length at which the contraction force was at 90% of the maximal tension. Cumulative concentration-response curves of isoproterenol, associated or not, with specific β_1 - and/or β_2 - and/or β_3 -AR antagonists were then determined by superfusion with successive increasing concentrations of isoproterenol to evaluate non-specific and subtype specific β -AR responses. Tension was measured using a digital storage oscilloscope HMO1024 (HAMEG Instruments, Mainhausen, Germany) and a strip chart recorder model 8188 (Gould, Les Ullis, France), and a digital tape recorder (model DTR-1200, Biologic, Claix, France).

2.7. Electron microscopy

Papillary muscles were fixed in glutaraldehyde (1 h30) followed by postfixation in 2% osmium tetroxide (1 h). After dehydration in a graded ethanol series, the fragments were embedded in epoxy resin. 70 nm sections were stained using the Reynolds method and examined using a JEOL-JEM 1010 (Jeol Korea Ltd, Seoul, South Korea).

2.8. Western blotting

Western blotting experiments were performed using left ventricle samples as previously described [15] using antibodies against: β_1 -AR (A-272, Sigma), β_2 -AR (ab36956, AbCam Ltd, Cambridge Science Park, Cambridge, UK), β_3 -AR (M-50, sc-50436, Santa-Cruz Biotechnology, Tebubio®, Le Peray en Yvelines, France), COX (ab133319, AbCam Ltd) and COX2 (ab133319, AbCam Ltd). Briefly, proteins were extracted in lysis buffer (RIPA + PMSF) and quantified using a BCA protein assay kit. 25 mg of each sample was separated on a SDS-PAGE gel and transfer to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% milk in TBS-T and then incubated with primary antibodies (β_1 -AR, 1:2000;

β_2 -AR, 1:2000; β_3 -AR, 1:5000; COX1, 1:800; COX2, 1:1330, GAPDH, 1:10,000) overnight at 4 °C. After 3 washes with TBS-T, membranes were incubated with a HRP conjugated secondary antibody (anti-rabbit, 1:50,000, sc-2054, Santa-Cruz Biotechnology). Densitometry analyses of bands were analyzed using Image Lab software and normalized to GAPDH.

2.9. Real time quantitative RT-PCR

Rat total RNA was extracted from left ventricle using TRIzol reagent (ThermoFischer). Reverse transcription was performed on 3 μ g of total RNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit with random primers according to manufacturer's protocol (ThermoFischer). Real-time PCR was performed using an equivalent of 10 ng input DNA. The primers used were; Ptgsl (Fwd: AGTACCAGGTGCTGGATGGA, Rev: GCTGCTCGTCATCCCATGTA, efficiency: 98.2%) and Ptgsl2 (Fwd: CATTCTTTGCCAGCACTTC, Rev: CTCTCCACCGATGACCTGAT, efficiency: 102.6%). Analysis was performed using the StepOne v2.3 software and gene expression was normalized to Gapdh (Fwd: TGATGGC ATGGACTGTGG, Rev: CAGCAATGCATCCTGCAC, efficiency: 98.9%) and Ywhaz (Fwd: CTTTGCTTTCTGGCTGCGAA, Rev: AGCTGAGGGAC ATCTGCAAC, efficiency: 102.5%). These housekeeping genes were previously determined according to the MIQE guidelines [25].

2.10. Survival curve

One hour after LPS injection, rats were randomly allocated for injection with either 1 mg·kg⁻¹ of Indomethacin in 1 mL of saline (0.9%) or the same volume of saline 0.9% intravenously as the control group. Rats were allowed to move freely in cages after treatment with food and water *ad libitum*. Survival was evaluated every hour during the following 48 h.

2.11. Drugs

Isoproterenol (a non-specific β -AR agonist), Indomethacin (a non-specific COX inhibitor), Nadolol (a β_1 -AR and β_2 -AR antagonist) and Triton X-100 were purchased from Sigma. CGP 20712 (a specific β_1 -AR antagonist), ICI 118,551 (a specific β_2 -AR antagonist), L-748,337 (a specific β_3 -AR antagonist), SC560 (a specific COX1 inhibitor) and NS398 (a specific COX2 inhibitor) were purchased from Tocris (Bristol, United Kingdom). NG-monomethyl-L-arginine, mono-acetate (L-NMMA) (a non-specific NOS inhibitor) was purchased from Calbiochem (La Jolla, California). Bosentan (a non-specific endothelin receptor antagonist) was purchased from Actelion (Allschwil, Switzerland).

2.12. Data and statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of n experiments. Significant differences in echocardiographic parameters and protein levels were determined using a Mann-Whitney *U* test. The comparison of hemodynamic parameters and concentration-response curves was performed by a two-way ANOVA (concentration, treatment) with repeated measures completed when appropriate by a Bonferroni test as *post hoc* analysis.

3. Results

3.1. Effect of endotoxemic shock on hemodynamic and echocardiographic parameters

Three hours after LPS injection animals presented a hypotension (60.1 ± 7.1 vs 87.9 ± 7.1 mmHg; $P < 0.05$) associated with tachycardia (449 ± 21 vs 330 ± 17 beats·min⁻¹; $P < 0.001$) (Table 1). An impaired systolic function, as shown by decreased ejection (74.5 ± 2.2 vs $83.8 \pm 2.7\%$; $P < 0.05$) and shortening fractions (38.6 ± 1.8 vs

Table 1

Evaluation of hemodynamic and cardiac parameters in control and LPS-treated rats.

	Control (n = 6–8)	LPS (n = 6–10)
Mean arterial pressure (mm Hg)	87.9 $\pm$ 7.1	60.1 $\pm$ 7.1*
Heart rate (bpm)	330.2 $\pm$ 16.6	488.8 $\pm$ 23.4*
Ejection fraction (%)	83.8 $\pm$ 2.7	74.5 $\pm$ 2.2*
Shortening fraction (%)	48.6 $\pm$ 3.0	38.6 $\pm$ 1.8*
Isovolumic relaxation time (ms)	24.1 $\pm$ 1.8	29.3 $\pm$ 2.3*
Early diastolic peak flow velocity (m·s ⁻¹)	0.98 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.06***

* $P < 0.05$, after a Mann-Whitney *U* test.

*** $P < 0.001$ after a Mann-Whitney *U* test.

$48.6 \pm 3.0\%$; $P < 0.05$), was associated with an impaired diastolic function characterized by an increased isovolumic time of relaxation (29.6 ± 2.31 vs 24.1 ± 1.77 ms; $P < 0.05$) and a reduction in early diastolic peak flow velocity (0.579 ± 0.057 vs 0.978 ± 0.048 m·s⁻¹; $P < 0.05$) (Table 1).

3.2. Effect of endotoxemic shock on cardiac β -AR function and expression

The isoproterenol concentration dependent papillary muscle contractility was increased by 105% in papillary muscles from LPS-treated rats compared to control papillary muscles (306 ± 31.4 vs $149 \pm 8.4\%$; $P < 0.05$) (Fig. 1A).

Both β_1 - and β_2 -AR total protein levels were decreased in left ventricles (LV) from LPS-treated rats compared to saline-treated muscles, by 56 and 47%, respectively (Fig. 1E and F). β_1 - and β_2 -AR membrane protein levels were unchanged in the LV from LPS-treated rats compared to controls, as shown by the preserved radioligand [³H]-CGP-12117 maximum binding capacity (Bmax) (Table 2). Moreover, neither the β_1 -/ β_2 -AR ratio or β_1 - and β_2 -AR affinities for the CGP-12117, as shown by the equilibrium dissociation constant (K_D) of the CGP-12117, were modified in the LV from LPS compared to control treated rats (Table 2). We also demonstrated, as above for β_1 - and β_2 -AR, an ~20% reduced total β_3 AR protein level in LV from LPS-treated rats compared to control-treated ones (Fig. 1G).

While β_2 - and β_3 -AR-induced effects on contractility (Fig. 1C and D, respectively) were not modified when the animals were pre-treated with LPS, we observed an increased β_1 AR-induced contractility (Fig. 1B) of 94% in LPS-treated papillary muscle compared to controls (534 ± 83 vs $276 \pm 35\%$; $P < 0.05$).

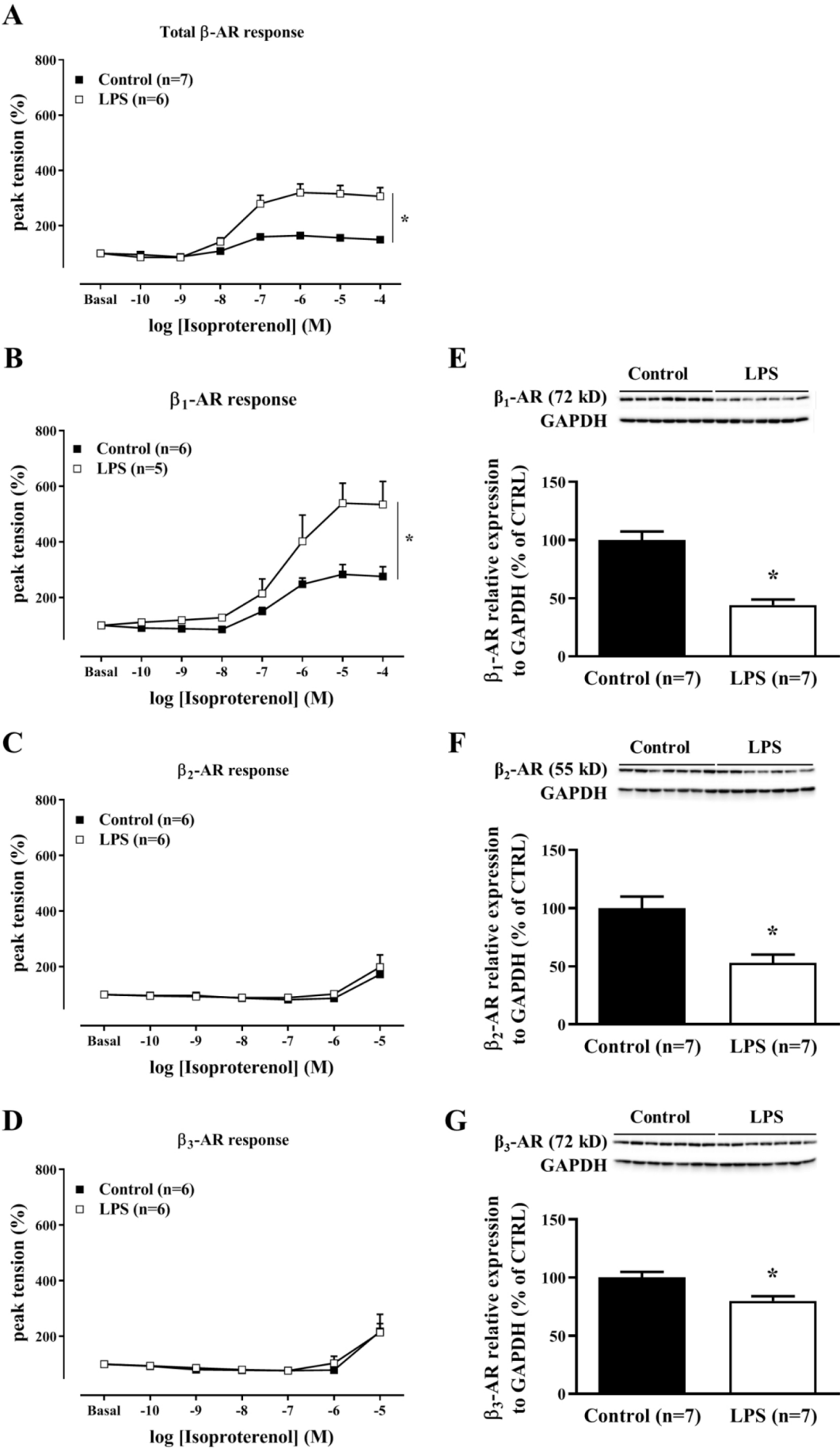
3.3. Endothelial involvement in the increased β_1 -AR response

To determine the involvement of the EE in this increased β_1 -AR-induced contractility the same experiments were performed on papillary muscles without EE. Compared to controls (Fig. 2A), papillary muscles pre-treated with Triton-X100 presented altered EE cells without alteration of the underneath cardiomyocytes. The viability of cardiomyocytes was measured by sarcomere and mitochondria integrities. The EE removal was confirmed by an accelerated relaxation in papillary muscles leading to a shortened contraction period (Fig. 2B).

The EE removal had no significant effect on the β_1 -AR-induced contractility on papillary muscle from control rats, whereas it completely abolished the increased of β_1 AR-induced contractility observed in LPS-treated rats (246 ± 29 vs $534 \pm 83\%$; $P < 0.05$) (Fig. 2C).

3.4. Endocardial endothelial mediators involved in the increased β_1 -AR response

To determine the cellular pathway(s) involved in the increased β_1 -AR-induced contractility, concentration-response curves to β_1 -AR stimulation were established in the presence of 1 μ M of LNMMA or 10 μ M of Bosentan. We show that neither L-NMMA nor Bosentan modified the



(caption on next page)

Fig. 1. Effects of lipopolysaccharide (LPS) administration on left ventricle papillary muscle functional response and expression of (A) β -, (B, E) β_1 -, (C, F) β_2 -, and (D, G) β_3 -AR subtypes. Papillary muscle results were expressed as the percentage of contraction from the basal contraction. Isoproterenol concentration-curves were performed in the presence of 1 μ M of ICI 118,551 and L-748,337 to evaluate β_1 -AR functional response, 1 μ M of CGP 20712 and L-748,337 to evaluate β_2 -AR functional response and 10 μ M of Nadolol to evaluate β_3 -AR functional response. Solid and open squares represent control and LPS-treated rats respectively. Values represent the mean $\pm$ SEM of a minimum of 5 rats per group, the results were considered significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$ after a Mann-Whitney U test or a two-way analysis of variance with repeated measures followed by Bonferroni test as *post hoc* analysis.

Table 2
Evaluation of binding site characteristics of [^{3} H]-CPG-12177 on left ventricles from control and LPS-treated rats. K_D : equilibrium dissociation constant; B_{max} : maximum binding capacity.

	Control (n = 4)	LPS (n = 4)
K_D (pM)	290.0 $\pm$ 28.0	218.3 $\pm$ 31.8
B_{max} (fmol·mg $^{-1}$ total tissue protein)	41.7 $\pm$ 2.2	44.6 $\pm$ 3.2
β_1 -AR (%)	65.5 $\pm$ 1.1	68.6 $\pm$ 1.5

β_1 -AR enhanced contractility of papillary muscle from LPS-treated rats (Fig. 2D). These molecules had no more effects on the β_1 -AR-induced contractility on papillary muscle from control rats (data not shown). In another set of experiments, we assessed the involvement of the cyclooxygenases (COX) pathway in the increased β_1 -AR contractility.

These concentration-response curves to β_1 -AR stimulation were constructed in the presence of 10 μ M of indomethacin (Fig. 3A). While indomethacin had no significant effect on the β_1 -AR-induced contractility of papillary muscle from control rats (data not shown), it totally blunted the potentiated β_1 -AR-induced contractility observed on papillary muscle from LPS-treated rats (312 $\pm$ 59 vs 534 $\pm$ 83%; $P < 0.05$). To further explore the COX isoforms involved in this phenomenon, similar experiments were performed in the presence of 3 μ M of SC560 or NS398 (Fig. 3A). It appeared that both drugs inhibited the potentiated β_1 -AR-induced contractility observed on papillary muscles from LPS-treated rats (SC560: 261 $\pm$ 31 vs 534 $\pm$ 83%; NS; 398: 258 $\pm$ 41 vs 534 $\pm$ 83%; $P < 0.05$) without any effect on the β_1 -AR-induced contractility recorded on papillary muscles from control rats (data not shown). COX1 and COX2 mRNA expression (Fig. 3B and C, respectively) and protein expression (Fig. 3D and E, respectively) were

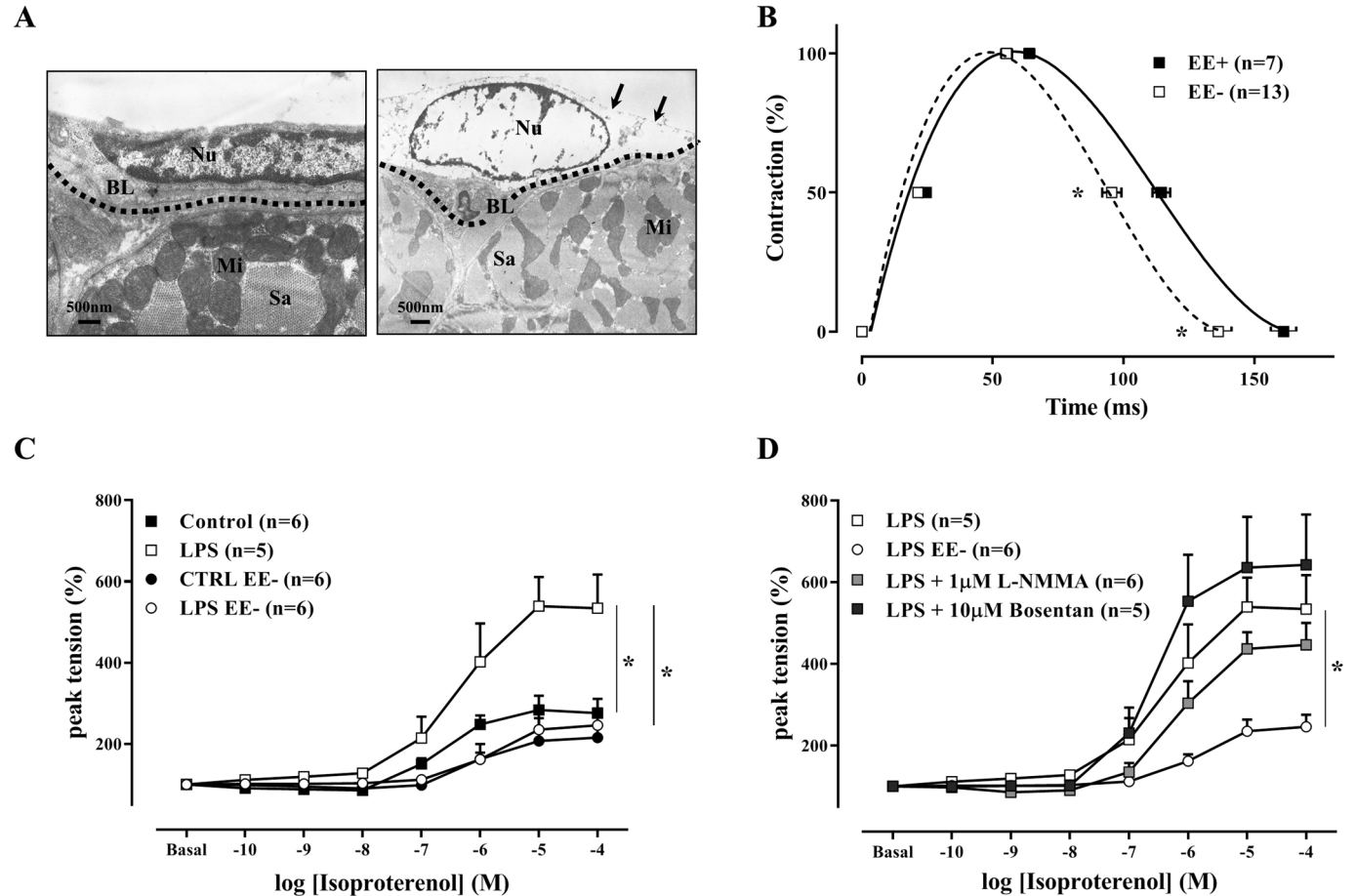


Fig. 2. Effects of Triton-X100 pretreatment (A-B) on endocardial endothelium (EE) integrity. Effects of endocardial endothelium (C) and NOS and endothelin signaling pathways (D) on the β_1 -adrenergic-potentiate contractility in LPS-treated rats. (A) Cardiomyocyte mitochondria (Mi) and sarcomere (Sa) integrities were evaluated using electron microscopy of papillary muscles with preserved (left) or altered (right) EE. Arrow: disruption site of the plasmatic membrane of endothelial cells, BL: basal lamina, Nu: Nucleus. (B) Papillary muscle contractility was evaluated with preserved (solid square) or altered (open square) EE (C–D). Isoproterenol concentration-curves were performed in the presence of 1 μ M of ICI 118,551 and L-748,337. β_1 -AR-induced contractility was evaluated in control (solid symbol) and LPS (open symbol) with (square) or without endocardial endothelium (circle). In LPS papillary muscles, β_1 -AR-induced contractility was evaluated in the presence of L-NMMA (light grey square) or Bosentan (dark grey square). Results are expressed as the percentage of contraction from the basal contraction. Values represent mean $\pm$ SEM of a minimum of 5 rats per group, and the results were considered significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$ after a two-way analysis of variance with repeated measures followed by Bonferroni test as *post hoc* analysis.

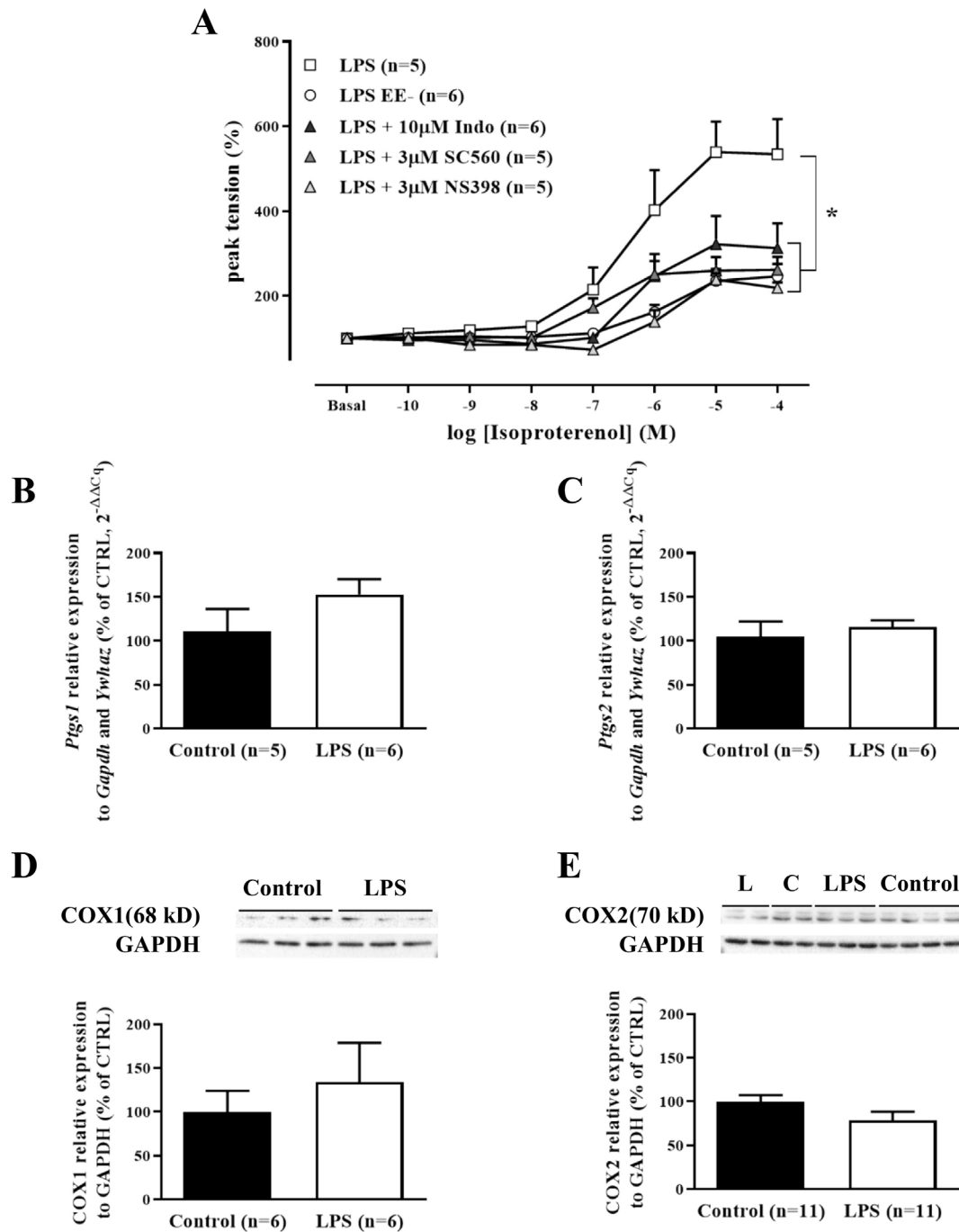


Fig. 3. Effects of (A) COX signaling pathway (LPS) on the β_1 -adrenergic-potentiate contractility in LPS rats and left ventricle RNA and protein expression of (B and D) COX1 and (C and E) COX2 isoforms. Papillary muscle experimental results were expressed as the percentage of contraction from the basal contraction. Isoproterenol concentration-curves were performed in the presence of 1 μ M ICI 118,551 and L-748,337. β_1 -AR-induced contractility was evaluated for LPS papillary muscles with (open square) or without endocardial endothelium (open circle) and in the presence of indomethacin (dark grey triangle), SC560 (medium grey triangle) or NS398 (light grey triangle). Western blot experiments were corrected for protein levels using GAPDH. Values represent mean $\pm$ SEM of a minimum of 5 rats per group. The results were considered significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$ after a Mann-Whitney U test or a two-way analysis of variance with repeated measures followed by Bonferroni test as *post hoc* analysis.

not different in left ventricles from LPS compared to control-treated animals.

3.5. Survival experiments

COX pathway inhibition in our endotoxemic shock model was evaluated through survival experiments. While every control rat survived after NaCl injection (as expected), LPS rats began dying 9 h after

the LPS injection, and all of them died by 18 h, with a median survival of 12 h. Rats treated with an intravenous injection of indomethacin ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 1 h after LPS injection began dying almost as quickly as the untreated rats but presented a significantly extended survival to 48 h after the LPS injection with a median survival of 19 h (Fig. 4).

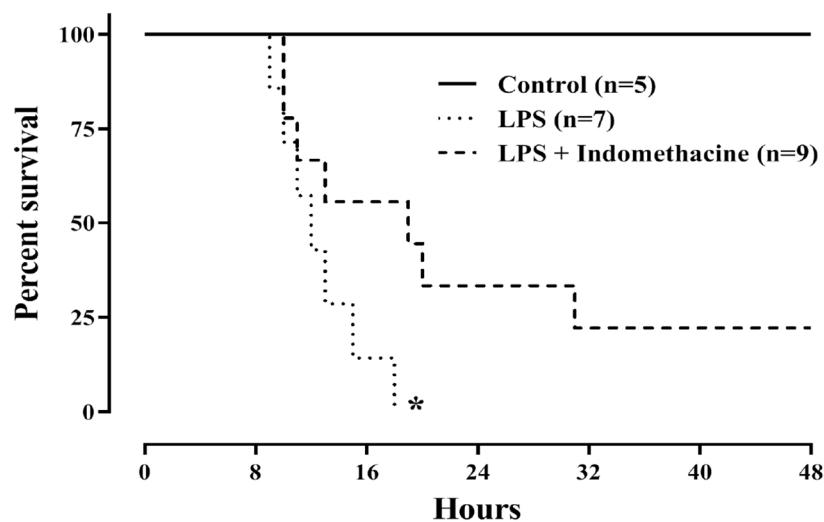


Fig. 4. Effects of indomethacin on survival 48 h after LPS administration. Solid and dotted lines represent controls and treated rats respectively. Results were considered significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$ vs control and \$ $P < 0.05$ vs LPS after a Mantel-Cox test.

4. Discussion

While increased circulating plasma catecholamines are classically found in the early phase of septic shock [12], cardiac β -AR remodeling is poorly described in this disease. This study evaluated the protein expression of all three β -AR subtypes and functional remodeling in the hearts from rats at the early phase of the endotoxemic shock. An increased β -AR-induced contractility involving β_1 -AR was demonstrated in papillary muscle from LPS rats without any modifications in the β_1 -AR membrane protein level. Because endothelial dysfunction is largely expanded at the early phase of shock, we investigated its involvement in the β_1 -AR-induced contractility. Finally, using inhibitors and antagonists of various endothelial signaling pathways we demonstrated an involvement of both COX1 and COX2 isoforms, in the endothelial dysfunction dependent increased β_1 AR induced contractility.

4.1. Cardiac β -AR remodeling at the early phase of endotoxemic shock

Confirming our *in vivo* results, we observed alterations in papillary muscle contractility in basal conditions in LPS-treated rats. Our results using papillary muscles are consistent with another study using an isolated working heart model (data not shown), showing an increase in the response to isoproterenol on endotoxemic rats hearts independently of load conditions, which has been rarely evaluated in the literature at the early phase of endotoxemic shock. However, these results should be considered with caution. Indeed, the developed tension recorded must be standardized with the papillary muscle's diameter. The possibility for cardiac edema in the septic shock [26] could distort this parameter and the subsequent analyses. Thus, our results were expressed as the percentage of the peak tension measured in basal conditions to avoid this bias.

The global β -AR contractile response was increased in LPS-treated papillary muscles compared to control ones. This result is not in agreement with previous reports in the literature where β -AR contractility, evaluated using isoproterenol, was decreased [6,27–29]. However, in these studies the β -AR contractility was evaluated on isolated cardiomyocytes and/or after longer LPS challenges that could explain the reported differences.

To evaluate the specific involvement of β_1 -AR, β_2 -AR and β_3 -AR subtypes in left ventricles, we measured total and membrane β -AR subtype proteins levels. Western blot analysis showed that total protein for all three subtypes were decreased, while by binding analysis, we saw that membrane protein levels for β_1 - and β_2 -AR were not modified

indicating that AR membrane proteins are not different in both conditions. However, these binding experiments did not indicate possible functional effects of the specific β -AR. Previous experiments have demonstrated preserved β -AR expression at the cardiac membrane of rabbit heart 6 h after an LPS injection [6]. Nevertheless, in this study the specific expression of β_1 -AR and β_2 -AR were not investigated.

Functional remodeling was evaluated thanks to classical pharmacological experiments using isoproterenol associated with selective antagonists for each β -AR subtypes. We demonstrate that the isoproterenol increased cardiac contractility was dependent on β_1 -AR.

4.2. Endothelial dysfunction involvement in the increased β_1 -AR-induced contractility

As described by Brutsaert et al. in 2003, removal of the EE is associated with a switch to a faster relaxation time [30]. In our study, EE removal was confirmed by an accelerated relaxation in papillary muscles leading to a shortened contraction period (Fig. 2B), however this treatment could also have an impact on adrenoceptor binding capacities [31] and myocardial contractility [32]. When the EE was disrupted the β_1 ARincreased response was completely abolished. Interestingly, Triton X-100, at concentrations lower than the one used in this study, is able to inhibit L-type voltage calcium channels [33] which could interfere with our results. However, the β_1 -AR response was not modified in control papillary muscle following Triton X-100 treatment which is inconsistent with an action of this target in our model.

Mebazaa et al. demonstrated that the myocardium from endotoxemic rabbits is more sensitive to an endothelial control of contractile performance than myocardium from controls [8]. This control involves several endothelial signaling pathways such as NOS, endothelin receptors and COX pathways [8]. In our study, neither L-NMMA nor Bosentan induced any modification of the β_1 -AR-induced contractility observed in papillary muscles from LPS-treated rats. However, when a non-specific COX inhibitor was used the increased β_1 -AR-induced contractility was abolished. These data demonstrate for the first time the involvement of COX in the increased β_1 -AR cardiac contractility at the early phase of endotoxemic shock. Regulation of β -AR function through COX has previously been demonstrated on isolated equine arteries where COX2 decreased the β_2 -AR induced vasodilation [34].

However, in our study, the absence of blood components in the perfusion medium does not allow a perfect extrapolation of the mechanisms encountered *in vivo*. Indeed, leukocytes are known to regulate

EE-dependent decreased cardiac contractility during sepsis [9]. This decreased contractility is dependent on the production of NO after the release of lysozymes by leucocytes.

When both COX isoforms were inhibited independently, the β_1 -AR increased contractility was abolished suggesting the involvement of both COX1 and COX2. However, it seemed that isoproterenol potency was lower when using the COX2 inhibitor compared to the COX1 inhibitor. The lack of statistical difference may be due to the group sizes. This tendency is consistent with a major involvement of COX2 in this abolished β_1 -AR-induced increased contractility. No increase in COX2 protein level expression in the left ventricle from LPS-treated rats at such an early stage was reported, yet it is in conflict with previous reports [35]. Modifications in the EE could easily be masked by other cells types.

COX isoforms are the rate limiting enzymes in the prostanoid biosynthesis pathways [36]. Prostanoids are recognized at the membrane of cardiomyocytes by seven-transmembrane receptors coupled to G proteins [37,38]. Interestingly, a previous report demonstrated that Treprostinil, a prostacyclin analogue, improved isoproterenol-induced cardiac contractility using both isolated cardiomyocytes and Langendorff experiments in healthy rats [39].

Whether the endothelial COX dependent increased β_1 -AR-induced contractility involves only the activation of the PKA pathway or is also activated by the Epac/CaMKII pathway remains to be determined. While the activation of Epac pathways through prostanoid receptors has never been demonstrated in cardiomyocytes, several studies have demonstrated activation of Epac pathways through prostanoids receptors in rat microglia [40], in human mesenchymal stem cells [41] or fibroblasts [42]. The possible deleterious effects of the β_1 -AR stimulation were not evaluated in this study but should not be excluded and could explain the positive effects of indomethacin on the survival of LPS-treated rats over 48 h. These effects of indomethacin confirm the results from numerous previous preclinical reports [43]. However, clinical studies using COX inhibitors a few hours after sepsis diagnosis, did not demonstrate any beneficial effects during the septic shock [44–46].

The endotoxemic shock model is probably not the most relevant model for studying septic shock. Nevertheless, it reproduces an acute endothelial dysfunction such as can be observed in septic shock but also in other situations such as after cardiopulmonary bypass or myocardial infarction. Some of these circulatory failure situations are potentially linked to endotoxin translocation during ischemia-reperfusion damage to the gastrointestinal mucosa [47].

5. Conclusion

Our work demonstrates an increased β_1 -AR-induced cardiac contractility at the early phase of endotoxemic shock. The removal of the EE abolished this increased β_1 -AR response, suggesting involvement of endothelial dysfunction in the regulation of this phenomenon. We demonstrate the involvement of both COX1 and COX2 isoforms in this increased β_1 -AR contractility, and show an improved survival in LPS-treated rats treated with indomethacin 1 h after LPS administration. These results suggest a potentially beneficial effect of COX inhibitors in the management of the cardiac dysfunction observed at the initial phase of septic shock.

Financial support

This study was financially supported by the “Fédération Française de Cardiologie” and the “Fondation de France”.

Authors' contributions

DR and BR performed most of the experimental work; ME and DG performed papillary muscle experiments; LA, AG, AE, NM, BL, assisted experiments; IM participated in the study conception; BR, BL, CG

participated in study conception and design as well as data analysis and interpretation; DR, BR, MF, CG, BL drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

We would like to thank Chrystelle Bailly, Stéphanie Lemarchand-Mindé, Amandine Lefebvre and Patricia Charpentier for animal care. We also would like to thank Claire Toquet and Paul Pilet for electron microscopy experiments, acquisitions and analysis. Finally, we would like to thank Bryce van Denderen for correcting the English language.

References

- [1] D.F. Gaieski, J.M. Edwards, M.J. Kallan, et al., Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States, *Crit. Care Med.* 41 (2013) 1167–1174.
- [2] J.-L. Vincent, J.C. Marshall, S.A. Namendys-Silva, et al., Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit, *Lancet Respir. Med.* 2 (2014) 380–386.
- [3] R.P. Dellinger, M.M. Levy, A. Rhodes, et al., Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012, *Crit. Care Med.* 41 (2013) 580–637.
- [4] W.C. Aird, The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome, *Blood* 101 (2003) 3765–3777.
- [5] C. Ince, P.R. Mayeux, T. Nguyen, et al., The endothelium in sepsis, *Shock Augusta Ga* 45 (2016) 259–270.
- [6] N. Matsuda, Y. Hattori, Y. Akaishi, et al., Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits, *Anesthesiology* 93 (2000) 1465–1473.
- [7] S. Corda, A. Mebazaa, B. Tavernier, et al., Paracrine regulation of cardiac myocytes in normal and septic heart, *J. Crit. Care* 13 (1998) 39–47.
- [8] A. Mebazaa, L.D. Martin, J.L. Robotham, et al., Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE2, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25 (1993) 245–248.
- [9] S.N. Mink, R. Bose, D.E. Roberts, et al., Lysozyme binding to endocardial endothelium mediates myocardial depression by the nitric oxide guanosine 3',5' monophosphate pathway in sepsis, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 615–625.
- [10] S. Smiljic, The clinical significance of endocardial endothelial dysfunction, *Med Kaunas Lith* 53 (2017) 295–302.
- [11] D. Annane, F. Trabold, T. Sharshar, et al., Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (1999) 458–465.
- [12] S.R. Ostrowski, R.M.G. Berg, N.A. Windeløv, et al., Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis: a prospective study, *J. Crit. Care* 28 (2013) 586–596.
- [13] Y. Fu, H. Xiao, Y. Zhang, Beta-adrenoceptor signaling pathways mediate cardiac pathological remodeling, *Front Biosci Elite Ed* 4 (2012) 1625–1637.
- [14] C. Gauthier, V. Leblais, L. Kobzik, et al., The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 1377–1384.
- [15] R. Thangamalai, K. Kandasamy, S. Sukumarn, et al., Atorvastatin prevents sepsis-induced downregulation of myocardial β_1 -adrenoceptors and decreased camp response in mice, *Shock* 41 (2014) 406–412.
- [16] C. Tang, J. Yang, L.L. Wu, et al., Phosphorylation of beta-adrenergic receptor leads to its redistribution in rat heart during sepsis, *Am. J. Phys.* 274 (1998) R1078–R1086.
- [17] P. Calzavacca, Y.R. Lankadeva, S.R. Bailey, et al., Effects of selective β_1 -adrenoceptor blockade on cardiovascular and renal function and circulating cytokines in ovine hyperdynamic sepsis [Internet], *Crit. Care* 18 (2014) [cited 2019 Jul 19] Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262191/>.
- [18] T. Suzuki, H. Morisaki, R. Serita, et al., Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats, *Crit. Care Med.* 33 (2005) 2294–2301.
- [19] C. Wei, H. Louis, M. Schmitt, et al., Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock, *Crit Care Lond Engl* 20 (2016) 407.
- [20] G. Godlewski, E. Schlicker, U. Baranowska, et al., Recruitment of functionally active heart beta2-adrenoceptors in the initial phase of endotoxemic shock in piglets, *Shock Augusta Ga* 26 (2006) 510–515.
- [21] S. Moniotte, C. Belge, B. Sekkali, et al., Sepsis is associated with an upregulation of functional beta3 adrenoceptors in the myocardium, *Eur. J. Heart Fail.* 9 (2007) 1163–1171.
- [22] D. Roul, B. Rozec, G. André, et al., Increased β_2 -adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats, *Vasc. Pharmacol.* 72 (2015) 181–189.
- [23] N. Merlet, N. Piriou, B. Rozec, et al., Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat, *PLoS One* 8 (2013) e64711.

- [24] C. Gauthier, G. Tavernier, J.N. Trochu, et al., Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 687–693.
- [25] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [26] C.A. Schmittinger, M.W. Dünser, C. Torgersen, et al., Histologic pathologies of the myocardium in septic shock: a prospective observational study, *Shock Augusta Ga* 39 (2013) 329–335.
- [27] S. Yasuda, W.Y. Lew, Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca²⁺ in cardiac myocytes, *Circ. Res.* 81 (1997) 1011–1020.
- [28] J.P. Spiers, E.J. Kelso, J.D. Allen, et al., Inotropic response to endothelin-1, isoprenaline and calcium in cardiomyocytes isolated from endotoxin treated rats: effects of ethyl-isothiourea and dexamethasone, *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 1275–1282.
- [29] D.B. Hoover, T.R. Ozment, R. Wondergem, et al., Impaired heart rate regulation and depression of cardiac chronotropic and dromotropic function in polymicrobial sepsis, *Shock Augusta Ga* 43 (2015) 185–191.
- [30] D.L. Brutsaert, Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 59–115.
- [31] J.S. Aguilar, M. Criado, E. De Robertis, Action of detergents on 3H-dihydroergokriptine binding and localization of alpha-adrenoceptors in synaptosomal membranes, *Eur. J. Pharmacol.* 61 (1980) 47–53.
- [32] D.J. Miller, G.L. Smith, The contractile behaviour of EGTA- and detergent-treated heart muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6 (1985) 541–567.
- [33] D. Narang, P.M. Kerr, J. Baserman, et al., Triton X-100 inhibits L-type voltage-operated calcium channels, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91 (2013) 316–324.
- [34] C. Zizzadoro, M. Caruso, C. Putignano, et al., Effects of endotoxin and influence of cyclooxygenase-2 on β -adrenergic mediated relaxation in isolated equine digital artery, *Vet J Lond Engl* 197 (2011) e48–e53.
- [35] B. Tunctan, B. Korkmaz, A.N. Sari, et al., Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91(phox) to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock, *Nitric Oxide Biol. Chem.* 33 (2013) 18–41.
- [36] C.A. Rouzer, L.J. Marnett, Cyclooxygenases: structural and functional insights, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl) (2009) S29–S34.
- [37] C.L. Bos, D.J. Richel, T. Ritsema, et al., Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1187–1205.
- [38] D.F. Woodward, R.L. Jones, S. Narumiya, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress, *Pharmacol. Rev.* 63 (2011) 471–538.
- [39] M. Fontana, H. Olschewski, A. Olschewski, et al., Treprostinil potentiates the positive inotropic effect of catecholamines in adult rat ventricular cardiomyocytes, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 779–786.
- [40] Y. Quan, J. Jiang, R. Dingledine, EP2 receptor signaling pathways regulate classical activation of microglia, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 9293–9302.
- [41] M.W. Jang, S.P. Yun, J.H. Park, et al., Cooperation of Epac1/Rap1/Akt and PKA in prostaglandin E(2)-induced proliferation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells: involvement of c-Myc and VEGF expression, *J. Cell. Physiol.* 227 (2012) 3756–3767.
- [42] F. Kojima, M. Kapoor, S. Kawai, et al., Prostaglandin E2 activates Rap1 via EP2/EP4 receptors and cAMP-signaling in rheumatoid synovial fibroblasts: involvement of Epac1 and PKA, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89 (2009) 26–33.
- [43] D.M. Aronoff, Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediat. Inflamm.* 2012 (2012) 696897.
- [44] M.T. Haupt, M.S. Jastremski, T.P. Clemmer, et al., Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group, *Crit. Care Med.* 19 (1991) 1339–1347.
- [45] G.R. Bernard, A.P. Wheeler, J.A. Russell, et al., The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 912–918.
- [46] D. Memiş, B. Karamanlioğlu, A. Turan, et al., Effects of lornoxicam on the physiology of severe sepsis, *Crit Care Lond Engl* 8 (2004) R474–R482.
- [47] B. Adamik, A. Kübler, A. Gozdzik, et al., Prolonged cardiopulmonary bypass is a risk factor for intestinal ischaemic damage and endotoxaemia, *Heart Lung Circ* 26 (2017) 717–723.

Early nebivolol treatment is beneficial in myocardial infarction in rats partly through β_3 -adrenoceptor remodelling

Leslie Audigane¹ | Antoine Persello^{1,2} | Nicolas Piriou¹ | Marine Ferron¹ |
Jean-Noël Trochu¹ | Benjamin Lauzier¹ | Chantal Gauthier¹ | Bertrand Rozec¹ 

¹L'institut du thorax, INSERM, CNRS, CHU
Nantes Nantes, UNIV Nantes, Nantes,
France

²InFlectis BioScience, Nantes, France

Correspondance

Bertrand Rozec, L'institut du thorax,
INSERM, 8 quai Moncousu, 44000 Nantes,
France.
Email: bertrand.rozec@chu-nantes.fr

Funding information

Fédération Française de Cardiologie;
Fondation de France; Fondation Daniel
Langlois pour l'Art, la Science et la
Technologie; Menarini Group

Abstract

It remains unknown whether β -blockers are useful and safe in acute myocardial infarction (MI). Owing to its pharmacological profile and vasodilating action, nebivolol (N) is useful in MI. The aim of the present study was to assess in rat whether early nebivolol treatment could be beneficial in MI. It remains unknown whether β -blockers are useful and safe in acute MI. On day (D) 0, male Sprague-Dawley rats underwent left coronary artery ligation (MI) or simple thoracotomy (SHAM). On D1 and D2, the rats were treated with either nebivolol (5 mg.kg⁻¹.day⁻¹, MI-N and Sham-N) or vehicle (V, MI-V and Sham-V). On D3, heart rate, left ventricle (LV) intrinsic contractility (PESmid) and arterial elastance were measured. Cardiac and aortic β -Adrenoceptor (AR) subtype mRNA were quantified using real time quantitative RT-qPCR. Catecholamine response was assessed on isolated heart and aortic rings with isoproterenol. PESmid was decreased in MI without worsening the decrease nebivolol. In LV, β_1 - and β_3 -AR mRNA were respectively decreased and increased in all MI. β_3 -AR mRNA increase was partly limited by nebivolol. Ex vivo, basal contractility was less decreased in MI-N than in MI-V. Isoproterenol response was only altered in MI-V. In MI aorta, Nebi prevented β_2 - and β_3 -AR mRNA increases. In addition, Acetylcholine-induced relaxation was lowered in MI-V but preserved with nebivolol. We demonstrated an early modulation of cardiovascular β_3 -AR transcription early MI. Despite its putative negative inotropic properties, nebivolol did not worsen cardiac function in basal conditions and preserved LV catecholamine response.

KEYWORDS

aorta, heart, myocardial infarction, nebivolol, rat, β -adrenergic receptor

1 | INTRODUCTION

β -blockers have widely proven their efficacy in reducing mortality and inducing reverse left ventricular (LV) remodelling in chronic heart failure (HF) treatment.¹ Nevertheless, the mechanisms leading to better survival are multiple and remain to be studied. The beneficial effects of β -blockers firstly occur in the haemodynamic stage

– essentially because of their negative inotropic properties that reduce long-term myocardial oxygen consumption.² They also limit sustained β -adrenoceptor (β -AR) stimulation by catecholamines and its side effects (eg β_1 -AR desensitization, cellular loss and fibrosis).³ Among the heterogeneous therapeutic class of β -blockers, nebivolol presents a specific pharmacological profile that could explain its better tolerability and exercise capacity in HF patients⁴ which could make it useful in acute HF. Sorrentino et al⁵ demonstrated in a long-term mouse model of infarction that nebivolol is able to improve

This work was supported by grants from Menarini International, "Fédération Française de Cardiologie", "Fondation de France" and "Fondation Langlois"

left ventricular function and reduce endothelial dysfunction. In fact, nebivolol is a vasodilator with highly selective β_1 -AR antagonist and β_3 -AR agonist properties. More recently, Zhang et al⁶ demonstrated the putative beneficial impact of long-term treatment with nebivolol after infarction in mice that they linked to nitric oxide (NO) production. Finally, nebivolol prevented β -AR desensitization in a stress comparable situation.⁷

Characterization of β_3 -AR in the heart was first evaluated in human,⁸ then in canine heart,⁹ in fish¹⁰ and in rabbit cardiomyocytes.¹¹ While β_1 - and β_2 -AR stimulation induces an increase in heart contractility, β_3 -AR stimulation produces a negative inotropic effect that is partly mediated by the activation of Gi/O and NO pathways.¹² β_3 -AR was also described in several vascular beds – principally in endothelial locations.¹³ Its stimulation produced vasodilation, like β_1 - and β_2 -AR stimulation. This effect results from NO pathway activation.¹⁴ In advanced chronic HF in humans, β_3 -AR expression has been shown to increase (+100 to 200%),¹⁵ whereas β_1 -AR expression decreased by approximately 35%,¹⁶ underlying a functional degradation and an altered contractile response to catecholamine at this end-stage of the disease.¹⁷ Such an early remodelling in β -AR expression has not yet been demonstrated in the acute phase of MI which can lead to HF, whereas this phase of the disease is characterized by sustained β -AR stimulation.¹⁸

In 2010, Gaemperli *et al* demonstrated that the down regulation of β -AR early after infarction could be associated with long-term incidence of congestive HF. We tested the hypothesis that early after MI, nebivolol could beneficially act on early β -AR remodelling. Indeed, β -blockers with vasodilator properties may be superior to non-vasodilator β -blockers in early management of MI, arteriolar dilatation would reduce the after-load of a failing heart. However, the potential negative inotropic effect of nebivolol through (a) β_1 -AR antagonistic and (b) β_3 -AR agonistic⁴ effects could negatively influence cardiac function in acute HF. The aim of the present study was therefore to investigate in a rat model of myocardial ischaemia whether nebivolol treatment could be safe and useful by recording

haemodynamic parameters, transcript expression of all β -AR subtypes and cardiac and aortic responses to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist.

2 | RESULTS

2.1 | Mortality

During the entire protocol, no mortality was observed in the SHAM groups. On D1, before the beginning of the treatment, the mortality rate of the MI-V was 10.8% ($P < .05$ vs SHAM-V). Under treatment, there was no significant difference between mortality rates in the MI.

2.2 | Effects of nebivolol treatment on cardiovascular parameters and endothelium function

Nebivolol treatment significantly decreased heart rate (Table 1). In the SHAM groups, nebivolol treatment reduced heart rate (SHAM-V: 367 ± 11 beats.min⁻¹, $n = 14$; SHAM-N: 310 ± 3 beats.min⁻¹, $n = 17$, $P < .001$). Similarly, nebivolol treatment decreased, to the same extent, heart rate in the MI rats (MI-V: 366 ± 7 beat.min⁻¹, $n = 12$; MI-N: 319 ± 8 beat.min⁻¹, $n = 12$, $P < .001$). Cardiac output (CO) showed an increase between the SHAM groups (SHAM-V: 50.14 ± 4 mL.min⁻¹, $n = 14$; SHAM-N: 71.94 ± 9 mL.min⁻¹, $n = 17$, $P < .01$) and between the MI groups (MI-V: 71.10 ± 7 mL.min⁻¹, $n = 12$; MI-N: 100 ± 10 mL.min⁻¹, $n = 12$, $P < .01$). On D3, the MI procedure led to an increase in cardiac output compared with the untreated SHAM (SHAM-V: 50.14 ± 4 mL.min⁻¹, $n = 14$; MI-V: 71.10 ± 7 mL.min⁻¹, $n = 12$; $P < .01$). These results indicate the efficacy of nebivolol treatment and therefore enabled us to perform the study. MI increased significantly the LVEDP in rats as shown in Table 1. Nebivolol treatment did not alter LVEDP in SHAM or in MI animals.

TABLE 1 Effect of nebivolol treatment on heart rate, left ventricular end-diastolic pressure, end-systolic pressure at midrange left ventricular volume, pulsed pressure, cardiac output, and minimum and maximum rate of pressure change in the ventricle

	SHAM-V Mean $\pm$ SEM (n)	SHAM-N Mean $\pm$ SEM (n)	MI-V Mean $\pm$ SEM (n)	MI-N Mean $\pm$ SEM (n)
Heart rate (beat.min ⁻¹)	367.64 $\pm$ 11.64 (14)	310.29 $\pm$ 8.47 *** (17)	366.42 $\pm$ 7.12 (12)	319.67 $\pm$ 7.54 ^{£££} (12)
LVEDP (mmHg)	10.93 $\pm$ 1.11 (14)	12.47 $\pm$ 1.41 (17)	15.62 $\pm$ 1.74 ** (13)	17.92 $\pm$ 2.02 ^{\$\$} (12)
PESmid (mmHg)	29.52 $\pm$ 2.87 (10)	23.74 $\pm$ 1.76 (14)	21.38 $\pm$ 2.75 (13)	24.17 $\pm$ 3.15 (12)
DP/dt max (mmHg.s ⁻¹)	5729.29 $\pm$ 384.30 (10)	5206.76 $\pm$ 264.83 (14)	4939.85 $\pm$ 231.09 (13)	4219.00 $\pm$ 30.33 (12)
DP/dt min (mmHg.s ⁻¹)	5286.36 $\pm$ 389.77 (10)	5464.82 $\pm$ 224.56 (14)	5378.62 $\pm$ 246.16 (13)	5090.55 $\pm$ 292.67 (12)
PP (mmHg)	30.86 $\pm$ 1.79 (14)	29.94 $\pm$ 1.41 (14)	25.08 $\pm$ 1.28 (13)	27.36 $\pm$ 1.48 (12)
CO (mL.min ⁻¹)	50.14 $\pm$ 4.39 (14)	71.94 $\pm$ 9.40** (14)	71.10 $\pm$ 7.13* (13)	100.63 $\pm$ 10.05 ^{\$\$} (12)

Note: HR (heart rate) was expressed in beats per minute (beats.min⁻¹). LVEDP (left ventricular end-diastolic pressure), PESmid (End-systolic pressure at midrange left ventricular volume) and pulse pressure (PP), cardiac output (CO). SHAM-V, SHAM-N: sham-operated rats receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively; MI-V, MI-N: infarcted rats (MI) receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively. For all histograms, values are mean $\pm$ SEM of n experiments performed on n different rats. Significant statistical difference: * $P < .05$; ** $P < .001$ vs. SHAM-V; \$\$\$ $P < .01$ vs. SHAM-N; £££ $P < .01$ vs. MI-V after two-way analysis of variance followed by Bonferroni test.

Finally, the intrinsic contractility parameter, PESmid, the difference between systolic blood pressure and diastolic blood pressure, the pulsed pressure (PP), and the DP/dt min or max were not significantly modified by MI or nebivolol treatment (Table 1).

The MAP was not affected by MI (Figure 1A). Treatment with nebivolol led to a small but significant decrease in MAP in the SHAM-N group (SHAM-V: 96 ± 4 mmHg, $n = 14$; SHAM-N: 87 ± 2 mmHg, $n = 17$, $P < .05$). This reduction in MAP was not found between MI-N and MI-V animals. Arterial elastance was significantly decreased in the MI-N (MI-V 349 ± 40 mmHg, $n = 12$; MI-N 232 ± 19 mmHg, $n = 11$, $P < .05$). The same trend was observed in SHAM-N vs. SHAM-V rats but did not reach a significant reduction (Figure 1B). To evaluate vascular endothelial function, concentration–relaxation curves to Ach were performed on the PE precontracted aortic rings harvested from animals in the four groups. A significant alteration of Ach-induced vasorelaxation ($P < .05$) was observed in MI-V compared with SHAM-V (Figure 1C). This alteration was completely prevented by nebivolol treatment.

2.3 | Effects of nebivolol on basal inotropy and lusitropy on isolated heart

Basal cardiac parameters were recorded in isolated perfused hearts. Inotropic and lusitropic parameters were assessed by contraction (dP/dt max) and relaxation (dP/dt min) velocities, respectively. Nebivolol treatment did not affect inotropic and lusitropic parameters in the SHAM group (Figure 2A and B). dP/dt max was significantly altered in MI (MI-V: 1201 ± 150 mmHg.s⁻¹, $n = 10$; SHAM-V: 2146 ± 160 mmHg.s⁻¹, $n = 14$, $P < .001$) (Figure 2A). Nebivolol administration did not worsen the inotropic alteration in MI and even tended more to induce an improvement, albeit non-significant (MI-V: 1201 ± 150 mmHg.s⁻¹; MI-N 1551 ± 202 mmHg.s⁻¹, $n = 10$; Figure 2A). dP/dt min was also altered in MI (MI-V: -653 ± 117 mmHg.s⁻¹, $n = 10$; SHAM-V: -1209 ± 139 mmHg.s⁻¹, $n = 14$, $P < .05$; Figure 3B). Nebivolol did not enhance the lusitropic alteration observed in MI (MI-V: -663 ± 117 mmHg.s⁻¹, $n = 10$; MI-N -912 ± 140 mmHg.s⁻¹, $n = 10$; Figure 2B).

2.4 | Effects of nebivolol treatment on cardiac and thoracic aorta β -mRNA expression

We quantified the mRNA expression of the three β -AR subtypes, and in the β_1 -AR mRNA expression was significantly reduced (approximately 35%) in the MI groups without the effect of nebivolol treatment (Figure 3A). Conversely, the β_2 -AR mRNA level was significantly increased by one-third in the MI groups (Figure 3B). This increase was not modified by nebivolol treatment. Surprisingly, β_3 -AR mRNA expression was significantly increased by 10-fold in the MI animals compared with the SHAM rats. However, the increase in β_3 -AR mRNA expression observed in MI-V appeared to be limited by the nebivolol treatment (7-fold increase of β_3 -AR mRNA expression in MI-N compared with SHAM-N).

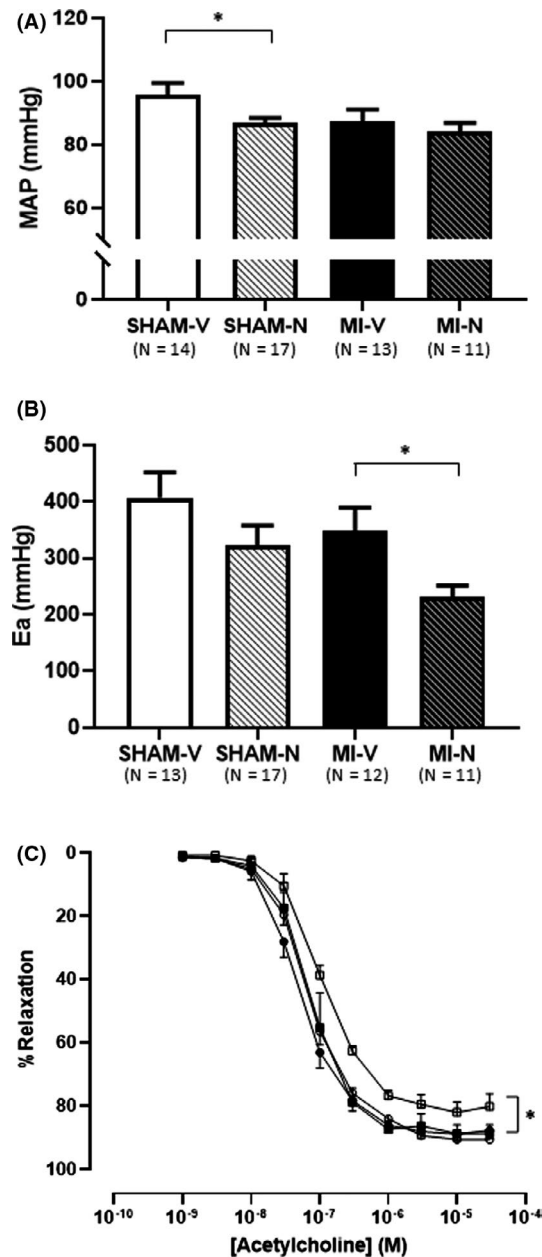


FIGURE 1 The effect of nebivolol treatment on mean arterial blood pressure (A) and basal arterial elastance (B) recorded by pressure–volume loops. The endothelial function was assessed by Ach concentration–relaxation curves (C) on thoracic aorta rings. Mean arterial blood pressure (MAP) and arterial elastance (Ea) were expressed in mmHg. Concentration–relaxation curves to Ach were constructed in aortic rings precontracted by phenylephrine. Vasodilation was expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. SHAM-V, SHAM-N: sham-operated rats receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively; MI-V, MI-N: infarcted rats (MI) receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively. Values are mean $\pm$ SEM of n experiments performed on n different rats. Significant statistical difference: * $P < .05$ after two-way analysis of variance followed by Bonferroni test

In the thoracic aorta, the β_1 -AR transcription level was not modified in any groups (Figure 3D) whereas β_2 -AR and β_3 -AR transcripts were significantly increased in MI-V ($n = 5$) by 2- and 7-fold

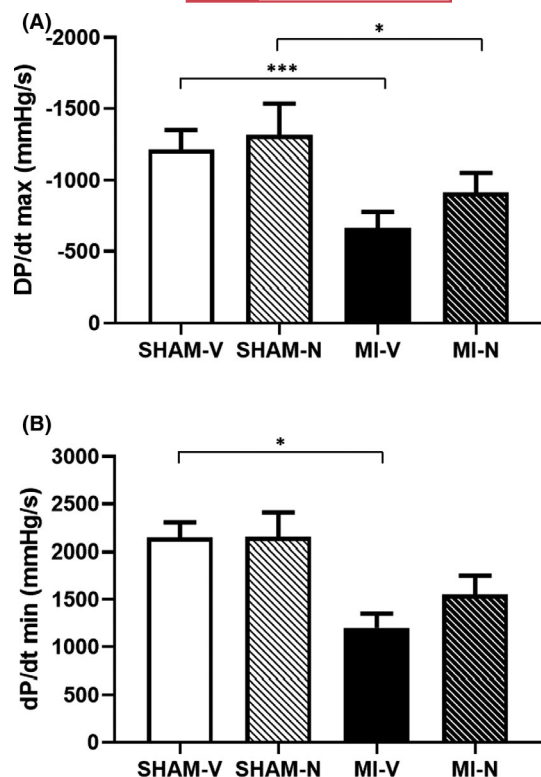


FIGURE 2 Basal inotropy (A) and lusitropy (B) in isolated heart. Contraction (dP/dt max) and relaxation (dP/dt min) velocities were expressed in mmHg.s⁻¹. SHAM-V, SHAM-N: sham-operated rats receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively; MI-V, MI-N: infarcted rats (MI) receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively. Velocities were expressed in mmHg.s⁻¹. Values are mean $\pm$ SEM of *n* experiments performed in *n* different rats. Significant statistical difference: * $P < .05$; *** $P < .001$ after two-way analysis of variance followed by Bonferroni test

respectively vs. SHAM-V ($n = 5$, $P < .01$ for both β -AR subtypes; Figure 3E and F). Nebivolol treatment completely prevented the transcription increase of β_2 -AR and β_3 -AR observed in MI-V (Figure 3E and F).

2.5 | Effects of nebivolol treatment on isolated heart and thoracic aorta ring response to catecholamine

The response to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist, on isolated heart (Figure 4) in the four groups showed a positive inotropic response in a concentration-dependent manner. However, in MI-V, this positive inotropic response was significantly altered as reflected by the E_{max} value which was the maximal response obtained in the presence of 10 μ mol/L isoproterenol (MI-V: $E_{max} = 2979 \pm 228$ mmHg.s⁻¹, $n = 8$; SHAM-V: $E_{max} = 5239 \pm 228$ mmHg.s⁻¹, $n = 8$, $P < .05$). Surprisingly, in MI rats, nebivolol treatment partly prevented the inotropic response alteration: the isoproterenol-induced positive

inotropic response of MI-N rats reached a similar level to that of the SHAM-N group (Figure 4A). Similar changes were observed for the lusitropic effect induced by isoproterenol (Figure 4B). Isoproterenol induced a concentration-dependent increase of dP/dt min in the four groups. This positive lusitropy was significantly reduced in MI-V (MI-V: $E_{max} = -2016 \pm 181$ mmHg.s⁻¹, $n = 8$; SHAM-V: $E_{max} = -3593 \pm 181$ mmHg.s⁻¹, $n = 8$, $P < .05$). This alteration was partly prevented by nebivolol treatment in the MI-N rats who presented a similar lusitropic response to isoproterenol than the SHAM-N rats. Nebivolol tends to slightly reduce the lusitropic effect of isoproterenol without significance in MI-N and SHAM-N.

In thoracic aortic rings precontracted with PE, isoproterenol induced a concentration-dependent relaxation, which was not modified by MI or nebivolol treatment (Figure 4C).

3 | DISCUSSION

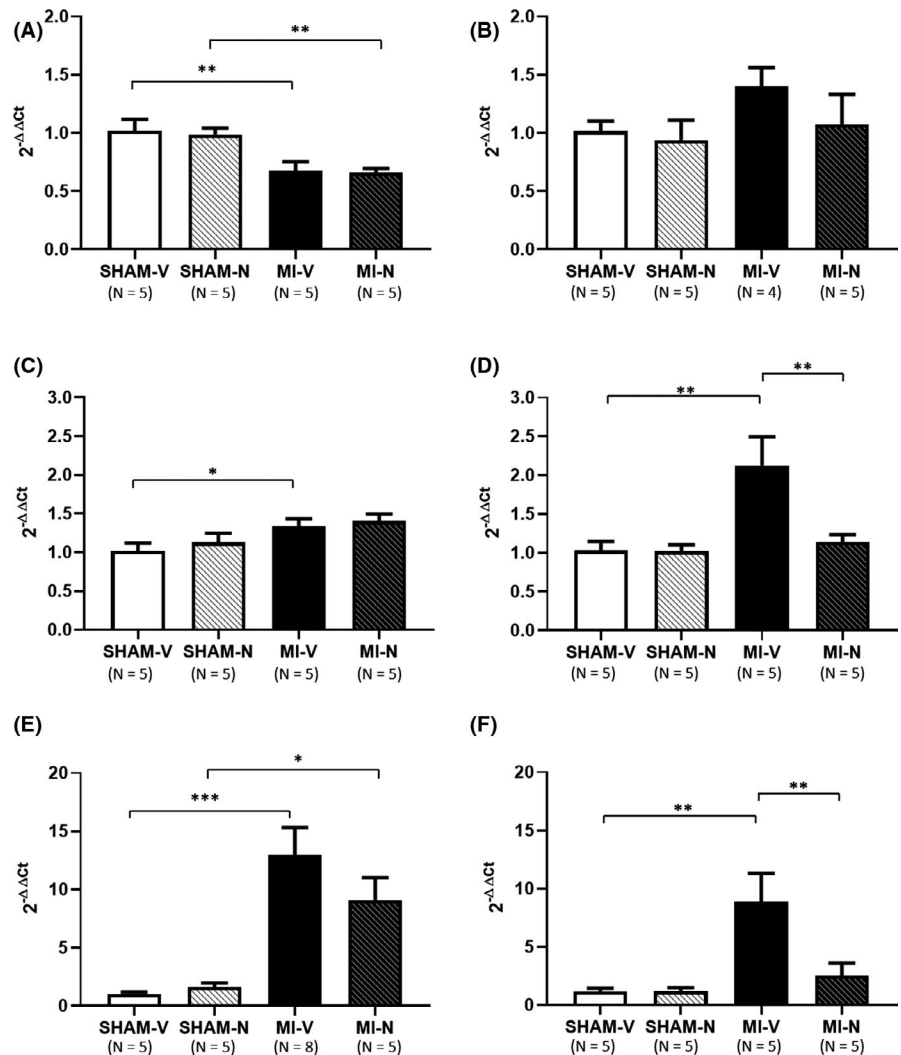
The present study demonstrated that nebivolol, a highly selective β_1 -AR antagonist, and β_3 -AR agonist properties prevented endothelial dysfunction. We also demonstrated, for the first time, an early remodelling of LV β -AR transcription with a β_1 -AR mRNA levels decrease and a β_3 -AR mRNA levels increase rapidly after MI. It was associated with significant alteration of the positive inotropic and lusitropic responses induced by isoproterenol. Nebivolol treatment did not normalize β -AR mRNA levels but the alteration of LV function was partly prevented. In the thoracic aorta, MI also produced an alteration of β -AR transcription with β_2 and β_3 -AR mRNA increases without modification of the isoproterenol-induced vasorelaxation. This transcription increase was prevented by nebivolol treatment.

3.1 | Haemodynamic effects of early nebivolol treatment in acute heart failure

The significant decrease in heart rate observed in nebivolol-treated animals validated the efficacy of β -blockade under our experimental conditions. Moreover, LVEDP was significantly higher in all MI groups treated or not by nebivolol, compared with the SHAM groups, which confirms that all MI animals presented acute decompensated HF in our study. As already reported, β -blocker and more specifically nebivolol, did not significantly worsen LVEDP increase in MI-N compared with MI-V.¹⁹

In isolated heart, the basal LV contraction velocity was altered after MI. Nebivolol treatment tended to preserve the dP/dt max value. A similar trend was observed in vivo where nebivolol did not impair intrinsic LV contractility, independently of LV load conditions, in MI-N compared with MI-V. These results therefore demonstrate that despite its dual potential negative inotropic effects through β_1 -antagonistic and β_3 -agonistic properties, nebivolol remained well tolerated in acute HF. This is in agreement with the Triposkiadis *et al* finding in human chronic systolic HF where nebivolol did not

FIGURE 3 Left ventricular (A,B,C) and thoracic aorta (D,E,F) transcript levels of β_1 -AR (A,D), β_2 -AR (B,E) and β_3 -AR (C,F). SHAM-V, SHAM-N: sham-operated rats receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively; MI-V, MI-N: infarcted rats (MI) receiving either vehicle (V) or nebivolol (N) treatment, respectively. In individual samples, each mRNA value was corrected for the HPRT mRNA value. Levels in SHAM-V were arbitrary assigned a value of 1, and in the other groups, mRNA values corresponded to the relative expression related to SHAM-V. Values are mean $\pm$ SEM of *n* experiments. Significant statistical difference: * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$ after two-way analysis of variance followed by Bonferroni test



modify cardiac output and pulmonary capillary wedge pressure which is well known to be close to LVEDP in right heart catheterization.²⁰ In this latter study, nebivolol tolerance was better than other recommended β -blockers in HF treatment, metoprolol tartrate, regarding cardiac output and pulmonary capillary wedge pressure.² This could be linked to the differential effects of those compounds on systemic vascular resistances, because nebivolol significantly decreased them whereas metoprolol tartrate did not.²⁰ Similarly in our study, nebivolol did produce a significant decrease in arterial elastance which is known to correlate with systemic vascular resistances.²¹ In addition, nebivolol may not only exert its beneficial vasodilator effect on peripheral arteries since it also improves coronary flow reserve in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.²² These cumulative effects of nebivolol are of interest after acute MI and could help to improve cardiac perfusion and therefore long-term cardiac function.

Thus, nebivolol appears to be well tolerated in our model of acute HF. Furthermore, our data suggest that it would have a beneficial effect on systemic vascular resistances that help to preserve cardiac output despite its potential negative inotropic effects during acute systolic LV dysfunction.

3.2 | β -adrenergic receptors transcripts remodelling

This study is the first to emphasize early remodelling in LV β -AR transcription at the acute phase of MI-induced HF. Three days after MI, β_1 -AR transcript expression was decreased by approximately 30% whereas β_3 -AR transcription presented a 10-fold increase compared with SHAM. At the vascular level, early β -AR transcript remodelling was also observed with an increase in both β_2 - and β_3 -AR transcripts without modification in β_1 -AR mRNA level. In the present study, the expression of β -AR transcripts was analysed in whole tissues. It was therefore not possible to discriminate whether the alterations of expression resulted from cardiomyocytes, endothelial cells, or both. In human advanced chronic HF, similar remodelling has been also described with a decreased β_1 -AR expression and β_3 -AR overexpression in LV.²³

Surprisingly, we noted that this early molecular remodelling could be modulated by two days of administration of nebivolol starting the day after MI. Nebivolol treatment did not modify LV β_1 -AR mRNA decrease, but it seems to prevent an increase in β_3 -AR transcription. At the vascular level, both the increased β_2 - and β_3 -AR transcription observed in MI-V were significantly prevented by nebivolol. A study performed

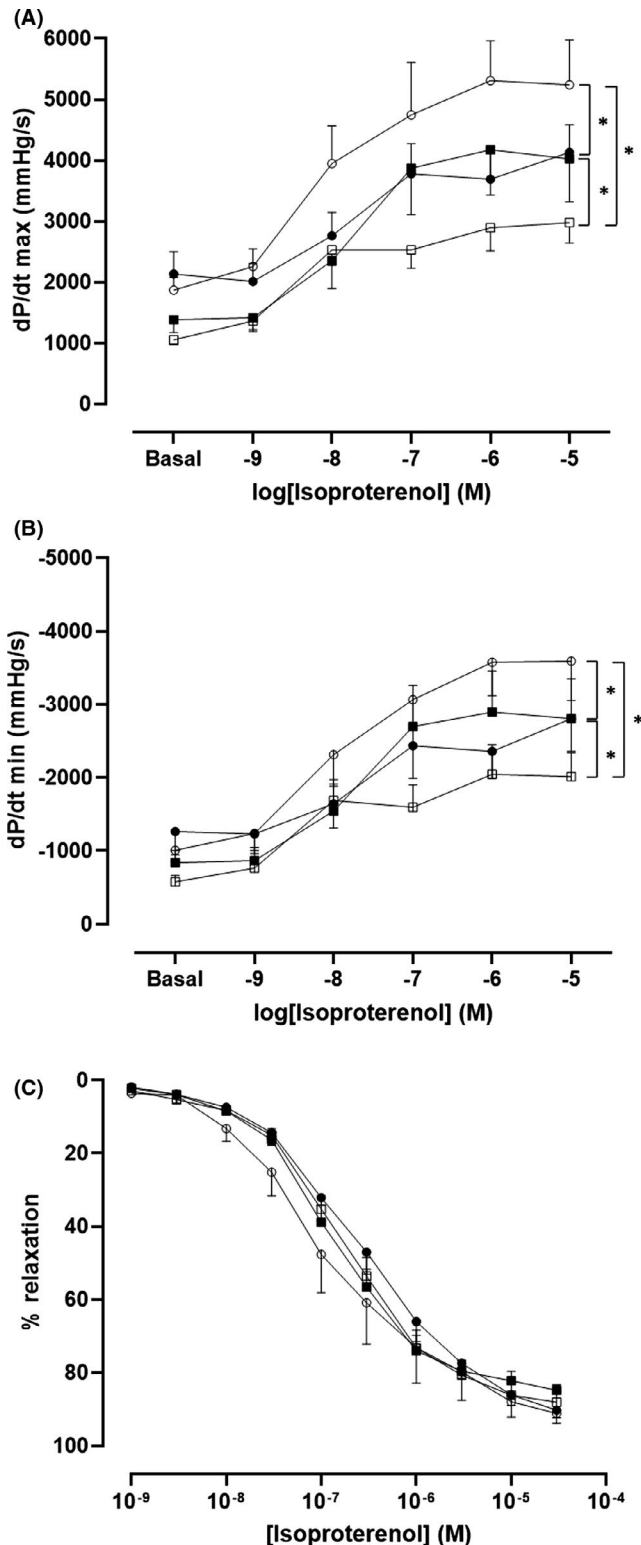


FIGURE 4 Inotropic (A) and lusitropic (B) responses to isoproterenol on isolated heart and effects of nebivolol treatment on isoproterenol-induced vasorelaxation (C). Inotropy and lusitropy were assessed by contraction ($dP/dt \text{ max}$) and relaxation ($dP/dt \text{ min}$) velocities, respectively. Those parameters are expressed in $\text{mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$. Concentration–relaxation curves to isoproterenol were performed in thoracic aortic rings precontracted by phenylephrine. That results were expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. Concentration–response curves to isoproterenol were performed on isolated heart and thoracic aortic ring obtained from infarcted (MI) or sham-operated (SHAM) animals treated with nebivolol (SHAM-N and MI-N) or not (SHAM-V, and MI-V). Data are mean $\pm$ SEM of n experiments performed in n different animals. Significant statistical difference: * $P < .05$ versus SHAM-V after two-way analysis of variance followed by Bonferroni test. $\circ$ — SHAM-V, $\bullet$ — SHAM-N, $\square$ — MI-V, $\blacksquare$ — MI-N

as a β_3 -AR agonist both in heart²⁵ and vessels.²⁶ One can hypothesize that the prevention of β_3 -AR mRNA increase in MI with nebivolol could be due to its β_3 -AR agonistic effect. A similar protective effect was obtained with carvedilol that has never been described as a β_3 -AR agonist. Those data therefore suggest a class effect that could be common to vasodilator β -blockers such as nebivolol and carvedilol. To support this hypothesis of a β -blocker class effect, a clinical trial reported similar beneficial effects of both nebivolol and carvedilol in patients with chronic HF.²⁷ Additional studies will be needed to elucidate the cellular mechanism involved in the protective effects of nebivolol and carvedilol on β_3 -AR mRNA increase both in MI, acute and chronic HF.

3.3 | Cardiac and vascular response to isoproterenol

At the vascular level, isoproterenol-induced relaxation was not different in the four groups whereas β_2 and β_3 -AR transcription increases were already significant. We could hypothesize that β -AR protein expression was not modified at this early time in the aorta. Further work will be needed to evaluate the consequences of nebivolol treatment on vascular response after a longer treatment.

Inotropic and lusitropic LV responses to isoproterenol were significantly altered in MI-V. β_3 -AR mRNA overexpression could be interpreted either as a protective mechanism against the detrimental effects of chronic β -AR stimulation or a detrimental mechanism that could potentially lead to further deterioration and HF. The opposite changes that occurred in β_1 - and β_3 -AR abundance in the human failing left ventricle with an imbalance between their inotropic influences could underlie the functional degradation of the human failing heart.²⁸ Surprisingly, in our study, nebivolol treatment was able to partially restore the cardiac response to isoproterenol stimulation as described in similar cases that third generation β -blockers make it possible to preserve adrenergic response by reducing exposure to a catecholamine storm. It also potentiates the response and preserves the pathway from desensitization as reported in septic shock, for example.²⁹ This result could be explained by the limitation of β_3 -AR expression increase observed in MI-V and not reported in the MI-N group.

in chronic HF showed that carvedilol, another vasodilator β -blocker, prevented the increase of β_3 -AR mRNA expression in failing rat hearts treated for three months whereas metoprolol tartrate, a selective β_1 -AR antagonist with no vasoactive properties, did not prevent this β_3 -AR overexpression.²⁴ The reasons that nebivolol and carvedilol, but not metoprolol, prevented increased β_3 -AR mRNA expression in acute or chronic HF remain unknown. However, nebivolol has been described

3.4 | Limitation

This study has been designed to evaluate the impact of early treatment with nebivolol after an acute cardiac event. Based on our results, one can conclude that acute treatment with nebivolol presents a potential interest, yet the exact mechanisms, and particularly the potential impact of nebivolol as a β_1 and β_2 antagonist while a β_3 agonist has not been fully evaluated in this study. It could have been of interest to evaluate the impact of nebivolol treatment on protein expression of the different β -AR, yet the current antibodies available lack specificity.

In order to have a long-term impact of the treatment, we also have evaluated in a limited number of animals, the impact of nebivolol treatment 14 days after MI. Interestingly, β_3 expression in the right ventricle and in the aorta expression was lower in the MI-N group when compared to MI-V with a reduction in infarct size (~7%, data not shown), which could indicate a limitation of the remodelling expression occurring after MI. A pharmacological approach using nebivolol and a β_3 antagonist of a β_3 agonist alone could have been of interest to specifically study the impact on β_3 -AR.

Results observed with the aorta with isoprenaline should also be confirmed on systemic vascular resistance with further experiments such as on mesenteric artery reactivity. Initially, vascular response to beta agonist was measured to evaluate the impact of the treatment b-AR remodelling and acute catecholamine response.

4 | CONCLUSION

We have demonstrated in an integrated haemodynamic study that nebivolol shows good tolerance in acute MI. This opens a dual perspective in human therapeutics. First, those data suggest that nebivolol could be used early in acute phase of MI to facilitate recovery during the acute phase by enhancing endogenous catecholamine LV response. Second, nebivolol could limit alterations of cardiac contractility leading to further advanced HF by limiting β_3 -AR transcription increase. This is in agreement with the Feldman et al hypothesis suggesting that the "key to success" with new generation β -blockers would lie with their ability to favourably alter the β -AR and Gi-Gs protein balance and subsequent downstream signalling.¹²

5 | METHODS

5.1 | Animals

Male Sprague-Dawley rats (225–249 g) were purchased from Janvier (Le Genest St, France). They were housed under standard conditions of temperature (21–24°C), humidity (40%–60%) and 12 hours light/dark cycle with the light period starting at 07:00. Food and water were available ad libitum. All animal protocols were approved by the ethics committee in charge of animal experimentation in the Pays de la Loire and were performed in accordance with French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU

for animal experiments, and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011).

5.2 | Myocardial infarction model

On day 0 (D0), the rats were anaesthetized with 5% isoflurane in air (Forene Abbott). The trachea was intubated with a 14 G cannula, and the lungs were mechanically ventilated with a small animal ventilator (Harvard Apparatus 683, EU) with a gas mixture of 2%–4% isoflurane and air. The rats had myocardial infarction (MI) via ligation of the left coronary artery. A thoracotomy was performed, the left anterior descending coronary artery was ligated with a 6/0 (Prolène F 1832, Ethicon) silk suture. Subsequently, the thorax was closed, drained and the trachea was extubated after spontaneous respiration recovery. Analgesia was performed using nalbuphine (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sc, Nubain, SERB, France) before and after surgery. Reproducibility of the infarct size was validated on D14 by calculating the average ratio of the infarcted area to the total area of the left ventricle ($30.5 \pm 3\%$, $n = 5$). The control rats (SHAM) were operated without coronary ligation.

5.3 | β -blocking treatment

On D1 and D2, MI and SHAM rats were treated either with vehicle (SHAM-V and MI-V) (polyethylene glycol 600%–0.05%) or nebivolol 5 mg.kg^{-1} body weight.day⁻¹ (SHAM-N and MI-N) by a subcutaneous injection twice a day. Then on D3, in order to avoid interaction between the β -blocking treatment and pharmacological studies, the rats were evaluated without receiving any previous treatment. The haemodynamic, vascular, and biomolecular experiments were performed in a blind manner. The distribution of the rats in the SHAM and MI groups and the administration of the treatments (V or N) was randomized. Obviously, cardiac ex vivo experiments were unblinded concerning MI.

5.4 | Pressure–volume loop measurements

The rats were anaesthetized with isoflurane (4% during dissection and 2% during measurement) and O_2 under spontaneous ventilation (to avoid the cardiovascular effects of positive respiratory pressure). The left jugular vein was isolated, ligated at the distal part and cannulated to sample small blood volume and to inject solution. The right carotid artery was isolated, ligated at the distal part and a 2F pressure–volume probe SPR-838 (Millar Instruments Inc, Houston, Texas) was inserted. After 1 minute of stabilization, arterial pressure was recorded for 1 minutes in the carotid artery and mean arterial blood pressure (MAP) was calculated. The probe was then pushed into the LV apex. Pressure–volume loops were first recorded under basal conditions. Heart rate (HR), LV end-diastolic pressure (LVEDP) and arterial elastance (Ea), reflecting vascular systemic resistances,

were then measured. In a second step, the abdominal cavity was opened and the inferior vena cava was clamped to rapidly change LV pre-load conditions and determine LV end-systolic pressure–volume relationship (ESPVR). ESPVR reflects LV intrinsic contractility, independently of LV pre- and after-load conditions. In rats, ESPVR shows contractility-dependent curvilinearity. We therefore used the following equation:³⁰ $Pes = a (VesV_o)^2 + b (VesV_o)$, where PES is end-systolic pressure, V_{ES} is end-systolic volume and V_o the volume for which ESPVR crosses the volume axis. Curvilinear ESPVR were compared by end-systolic pressure (PESmid) at midrange LV volume (LVV mid) during inferior vena cava occlusion determined by the following formula:^{30,31} $LVV\ mid = V + [(Ves\ max - Ves\ min)/2]$. After pressure–volume loop measurement, the rats received an intraperitoneal injection of heparin (3750 UI.kg⁻¹; Choay, Sanofi-Aventis, France). The chest was then opened to carefully harvest the heart and thoracic aorta for ex vivo functional experiments or molecular studies.

Haemodynamic parameters were recorded using IOX1.5.7 software (EMKA Technologies, Paris, France) and data were analysed using Datanalyst software (EMKA Technologies).

5.5 | Relative quantification of mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

After haemodynamic measurement, thoracic aorta and heart were removed. Hearts were separated into right and left ventricles without interventricular septum. Thoracic aortae were cleared of fat and connective tissues. Samples of aortae were then homogenized. RNA isolation, and RT-qPCR from LV and thoracic aortae were processed with the same probes, primers and references as previously described.³²

5.6 | Whole heart contractility

After removal, the heart was quickly placed in a cold Tyrode buffer (containing in mmol/L: NaCl, 137; KCl, 5.4; MgSO₄, 1.2; Na₂HPO₄, 1.2; Hepes, 20; CaCl₂, 1; pH 7.4). Next, the heart was mounted on a Langendorff system as previously described.³³ After the stabilization period, concentration–response curves to isoproterenol (a non-selective β -AR agonist) were constructed by perfusing growing concentrations (1 nmol/L to 10 μ mol/L). Data were then analysed using Datanalyst software (EMKA Technologies).

5.7 | Thoracic aorta preparation and tension studies in rat aortic rings

After isolation, descending thoracic aortae were cleared of fat and connective tissue and cut into 3 mm rings. Thoracic aortae were prepared, mounted and precontracted with phenylephrine (PE) as previously described.³² Maximum tension induced by PE was not

significantly different between the four groups of animals (data not shown). A minimal 70% relaxation in response to 1 μ mol/L acetylcholine (Ach) in PE precontracted rings confirmed the presence of a functional endothelium. The rings, once again precontracted by PE and cumulative concentration–response curve to Ach (1 nmol/L to 30 μ mol/L) or isoproterenol (1 nmol/L to 30 μ mol/L), were constructed. Relaxation produced by each concentration of agonist was measured after a steady state had been reached. Values are expressed as the percentage change in the maximal tension of vessel rings after addition of PE.

5.8 | Drugs

All molecules were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) except nebivolol, which was a generous gift from Menarini (Italy).

5.9 | Statistics

Mortality rates at D3 were compared with a χ^2 test. Basal parameters, concentration–response curves were compared with a two-way ANOVA for repeated measures followed by a Bonferroni test. RT-qPCR evaluation of transcript levels were compared with a One-way ANOVA test with a Dunn's multiple comparison test. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of n experiments obtained from n different animals. Differences were considered significant if $P < .05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Menarini International, "Fédération Française de Cardiologie", "Fondation de France" and "Fondation Langlois". We thank Mortéza Erfanian for his technical assistance, Chrystelle Bailly, Marie-Noëlle Hervé and Cyril Le Corre for animal care.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

ORCID

Bertrand Rozec  <https://orcid.org/0000-0002-2226-3982>

REFERENCES

1. Puymirat E, Aissaoui N, Cayla G, et al. Changes in one-year mortality in elderly patients admitted with acute myocardial infarction in relation with early management. *Am J Med*. 2017;130(5):555-563.
2. Andersson B, Blomström-Lundqvist C, Hedner T, Waagstein F. Exercise hemodynamics and myocardial metabolism during long-term beta-adrenergic blockade in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18(4):1059-1066.

3. Hamdani N, A. Linke W. Alteration of the Beta-Adrenergic Signaling Pathway in Human Heart Failure. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(13):2522-2531.
4. Veverka A, Salinas JL. Nebivolol in the treatment of chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(5):647-654.
5. Sorrentino SA, Doerries C, Manes C, et al. Nebivolol Exerts Beneficial Effects on Endothelial Function, Early Endothelial Progenitor Cells, Myocardial Neovascularization, and Left Ventricular Dysfunction Early After Myocardial Infarction Beyond Conventional β 1-Blockade. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(5):601-611.
6. Zhang Z, Ding L, Jin Z, et al. Nebivolol Protects against Myocardial Infarction Injury via Stimulation of Beta 3-Adrenergic Receptors and Nitric Oxide Signaling. Bader M, editor. *PLoS One*. 2014;9(5):e98179.
7. Ozakca I, Arioglu-Inan E, Esfahani H, et al. Nebivolol prevents desensitization of β -adrenoceptor signaling and induction of cardiac hypertrophy in response to isoprenaline beyond β 1-adrenoceptor blockage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(9):H1267-H1276.
8. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional β 3-adrenoceptor in the human heart. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(2):556-562.
9. Gauthier C, Tavernier G, Trochu JN, et al. Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of β 3-adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(2):687-693.
10. Imbrogno S, Angelone T, Adamo C, Pulerà E, Tota B, Cerra MC. Beta3-adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 24):4966-4973.
11. Audigane L, Kerfant BG, El Harchi A, et al. Rabbit, a relevant model for the study of cardiac β 3- adrenoceptors. *Exp Physiol*. 2009;94(4):400-411.
12. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1377-1384.
13. Rozec B, Gauthier C. β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):652-673.
14. Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, et al. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 1999;128(1):69-76.
15. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of β 3-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 2001;103(12):1649-1655.
16. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, et al. β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: Coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*. 1986;59(3):297-309.
17. Feldman DS, Elton TS, Sun B, Martin MM, Ziolo MT. Mechanisms of disease: Detrimental adrenergic signaling in acute decompensated heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(4):208-218.
18. Gaemperli O, Liga R, Spyrou N, et al. Myocardial beta-adrenoceptor down-regulation early after infarction is associated with long-term incidence of congestive heart failure. *Eur Heart J*. 2010;31(14):1722-1729.
19. Barrese V, Taglialatela M. New advances in beta-blocker therapy in heart failure. *Front Physiol*. 2013;4:323.
20. Triposkiadis F, Giamouzis G, Kelepesish G, Sitafidis G, Skoularigis J, Demopoulos V. Acute hemodynamic effects of moderate doses of nebivolol versus metoprolol in patients with systolic heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2007;45(2):71-77.
21. Kelly RP, Ting CT, Yang TM, et al. Effective arterial elastance as index of arterial vascular load in humans. *Circulation*. 1992;86(2):513-521.
22. Erdogan D, Gullu H, Caliskan M, et al. Nebivolol improves coronary flow reserve in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart*. 2007;93(3):319-324.
23. Belge C, Hammond J, Dubois-Deruy E, et al. Enhanced expression of β 3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation*. 2014;129(4):451-462.
24. Zhao Q, Wu TG, Jiang ZF, Chen GW, Lin Y, Wang LX. Effect of β -blockers on β 3-adrenoceptor expression in chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21(2):85-90.
25. Rozec B, Erfanian M, Laurent K, Trochu J-N, Gauthier C. Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1532-1538.
26. Evangelista S, Garbin U, Pasini AF, Stranieri C, Boccioletti V, Cominacini L. Effect of dl-nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells. *Pharmacol Res*. 2007;55(4):303-309.
27. Park K, Park T-H. Comparative effects of nebivolol and carvedilol on left ventricular diastolic function in older heart failure patients with preserved ejection fraction: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016;17(1):530.
28. Dessy C, Saliez J, Ghisda P, et al. Endothelial β 3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation β -blocker nebivolol. *Circulation*. 2005;112(8):1198-1205.
29. Coppola S, Froio S, Chiumello D. β -blockers in critically ill patients: from physiology to clinical evidence. *Crit Care*. 2015;19(1):119.
30. Burkhoff D, Mirsky I, Suga H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H501-H512.
31. Sato T, Shishido T, Kawada T, et al. ESPVR of in situ rat left ventricle shows contractility-dependent curvilinearity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;274(5):H1429-H1434.
32. Roul D, Rozec B, André G, et al. Increased β 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul Pharmacol*. 2015;72:181-189.
33. Merlet N, Piriou N, Rozec B, et al. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS One*. 2013;8(5):e64711.

How to cite this article: Audigane L, Persello A, Piriou N, et al. Early nebivolol treatment is beneficial in myocardial infarction in rats partly through β 3-adrenoceptor remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021;48:1007-1015. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13447>

OPEN

O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock

Marine Ferron^{1*}, Julien Cadiet¹, Antoine Persello¹, Valentine Prat¹, Manon Denis¹, Angélique Erraud¹, Virginie Aillerie¹, Mathieu Mevel², Edith Bigot³, John C. Chatham⁴, Chantal Gauthier¹, Bertrand Rozec⁵ & Benjamin Lauzier¹

Septic shock is a systemic inflammation associated with cell metabolism disorders and cardiovascular dysfunction. Increases in O-GlcNAcylation have shown beneficial cardiovascular effects in acute pathologies. We used two different rat models to evaluate the beneficial effects of O-GlcNAc stimulation at the early phase of septic shock. Rats received lipopolysaccharide (LPS) to induce endotoxemic shock or saline (control) and fluid resuscitation (R) with or without O-GlcNAc stimulation (NButGT–10 mg/kg) 1 hour after shock induction. For the second model, rats received cecal ligation and puncture (CLP) surgery and fluid therapy with or without NButGT. Cardiovascular function was evaluated and heart and blood samples were collected and analysed. NButGT treatment efficiently increased total O-GlcNAc without modification of HBP enzyme expression. Treatment improved circulating parameters and cardiovascular function in both models, and restored SERCA2a expression levels. NButGT treatment also reduced animal mortality. In this study, we demonstrate that in septic shock O-GlcNAc stimulation improves global animal and cardiovascular function outcomes associated with a restoration of SERCA2a levels. This pre-clinical study opens avenues for a potential therapy of early-stage septic shock.

Sepsis is a significant worldwide burden and a leading cause of death. According to Daniels, in 2011 over 20,000 people died worldwide per day from sepsis¹. A recent consensus report by Singer *et al.* defined septic shock as a systemic inflammatory response syndrome consecutive to an infection associated with both cardiovascular dysfunction and cellular metabolic alterations². Indeed, diagnostic factors of septic shock include hypotension, tachycardia, hyperlactatemia and organ dysfunction.

Myocardial depression occurs in about 50% of septic shock patients³. Whilst, the mechanisms involved in myocardial depression are not completely understood, numerous studies have determined that the common features include micro-vascular abnormalities, calcium deregulation, metabolic changes, mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte apoptosis⁴. Concomitant inflammatory responses resulting in the synthesis of high cytokine and chemokine levels (e.g. TNF α , IL-6) could also be responsible for myocardial dysfunction after septic or endotoxemic shock.

After antibiotic administration, which is the first recommended line of therapy, the main goal of septic shock treatment is to optimize oxygen supply to tissues to avoid the onset of ischemia and multiple organ failure. Thus, improvements in hemodynamic and cardiovascular function are the first goal for the management of patients⁵.

Much is known about the major metabolic pathways in the heart and the implication of flux alteration during the development of heart failure, however little is known about alternative metabolic pathways. The hexosamine biosynthetic pathway (HBP) leads to a unique form of protein glycosylation that has been studied intensively over the last decade, despite O-GlcNAcylation being first described in 1984 by Torres and Hart⁶. This posttranslational modification is a rapid and reversible process that regulates the activity or localization of proteins, and O-GlcNAcylation can compete with phosphorylation on serine and threonine residues. Flux through the HBP is modulated by the rate limiting enzyme L-glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) and only 2 enzymes can transfer or remove the GlcNAc moieties on a protein: O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) respectively. The level of O-GlcNAc can be modulated using pharmacological compounds

¹Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France. ²INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France. ³Biochemistry Department, Laënnec Hospital, CHU Nantes, Nantes, France. ⁴Division of Molecular and Cellular Pathology, Birmingham, United States. ⁵Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France. *email: ferronmarine@gmail.com

to decrease (e.g.: DON and Azaserine) or increase (e.g.: glucosamine, PUGNAc, NButGT) the level of protein O-GlcNAcylation. Whilst protein O-GlcNAcylation modulation seems to cause different effects in acute and chronic pathologies⁷, there is little evidence to suggest that a global increase in this post-translational modification could become a future therapeutic avenue to treat septic shock. In trauma-haemorrhage situations, glucosamine or PUGNAc administered during reperfusion increase survival of animals through an improvement in inflammatory responses and organ function⁸. More recently, Hwang *et al.* demonstrated in a septic shock model that pre-treatment with glucosamine improves survival thanks to a decrease in the inflammatory state in mice⁹.

In this context, we propose that an increase in protein O-GlcNAcylation by NButGT post-treatment could improve the outcome of septic shock in an animal model. We demonstrate that despite no improvement in the inflammatory state, increased protein O-GlcNAcylation improves global outcome in our septic shock rats. In our opinion, this treatment resulted in amelioration of cardiac function.

Results

NButGT efficiently increases total O-GlcNAc in septic shock without any consequence on major enzymes involved in the hexosamine biosynthetic pathway.

In septic shock rats (LPS and CLP) the level of O-GlcNAcylated proteins and HBP enzymes (OGT and OGA) were not modified when compared to control or Sham rat samples (Fig. 1), but an increase in GFAT, the limiting rate enzyme ($p = 0.0210$ vs Sham Fig. 2B) was observed in the CLP model. Except for OGA, which is slightly increased, neither O-GlcNAc levels nor OGT and GFAT expression were modified by fluid resuscitation. As expected, NButGT treatment, an OGA blocker, efficiently increased total O-GlcNAcylation of proteins 2 fold in the LPS model and by 2.5 fold in the CLP model (Figs. 1A and 2A). In these two models, this increase was not associated with modification of the three main enzymes regulating O-GlcNAc levels.

O-GlcNAc stimulation did not impact inflammatory responses. The evaluation of the inflammatory state of septic shock animals was measured on cardiac (RT-qPCR) and plasma (ELISA) samples (Fig. 3). LPS resulted in significant increases in pro-inflammatory IL-6 and TNF α cytokines in both analyses. However, fluid resuscitation alone or completed with NButGT treatment did not modify the inflammatory response of animals.

O-GlcNAc stimulation significantly reduces the impact of septic shock on circulating parameters.

Circulating parameters of the LPS-treated rats showed a reduction in blood pH ($pH\ 7.38 \pm 0.02$ in control; vs 7.31 ± 0.01 in LPS, $p < 0.01$) associated with a decrease in bicarbonate concentration and carbon dioxide partial pressure (Fig. 4A–C). These rats also presented an increase in circulating markers of hypoxia (lactate, control: 2.52 ± 0.37 , LPS: 4.74 ± 0.53 mmol/L, $p < 0.01$), renal filtration (creatinine, control: 25.3 ± 3.4 , LPS: 51.4 ± 7.8 μ mol/L, $p < 0.01$) and cardiac injury (troponin T, CTRL: 6.1 ± 1.0 , LPS: 156.5 ± 82.3 ng/L, $p < 0.05$) (Fig. 4D–F).

While fluid resuscitation alone was not associated with improvement of these parameters, in association with NButGT treatment it normalized circulating parameters such as HCO $_3^-$ ($p < 0.001$ vs LPS + FR) and pCO $_2$ ($p < 0.001$ vs LPS + FR). Furthermore, NButGT treatment induced a normalization of lactate (3.02 ± 0.27 mmol/L, $p < 0.001$ vs LPS + R), creatinine (33.7 ± 4.7 μ mol/L, $p = 0.001$ vs LPS + R) and troponin T (33.6 ± 11.6 ng/L, ns vs LPS + R) indicating improved organ function in NButGT animals. Finally, as shown in Fig. 4G, NButGT supplementation resulted in a 3-fold increase in survival time (26.8 h in NButGT vs 8.6 h in LPS + R, $p = 0.0242$).

O-GlcNAc stimulation improves cardiovascular function in an endotoxemic rat model.

To explore the putative beneficial effect of O-GlcNAc stimulation, our next step was to investigate cardiovascular function. As shown in Fig. 5A,B, endotoxemic shock induced by *iv* injection of LPS lead to hemodynamic alterations especially tachycardia. LPS-treated rats also presented systolic dysfunction (LVEF, 80.7 ± 2.1 in control vs $65.1 \pm 2.9\%$ in LPS, $p < 0.001$) and delayed relaxation (E/E' ratio, 25.4 ± 2.9 in control vs 17.0 ± 1.34 in LPS, $p < 0.05$) evaluated by echocardiography (Fig. 5C,D). Fluid resuscitation efficiently improved mean arterial pressure (similar to the control group) without any impact on heart function.

NButGT supplementation in the fluid resuscitation to stimulate protein O-GlcNAcylation did not further impact the mean arterial pressure (similar to the control and LPS + R group). However, it slightly restored cardiac function with an improvement in systolic function (LVEF, $75.0 \pm 1.7\%$, $p < 0.05$ vs LPS) and cardiac relaxation (E/E', 23.0 ± 2.0 , $p = 0.090$ vs LPS).

Improved plasma parameters and cardiovascular impact of O-GlcNAc stimulation is confirmed in a more relevant model of septic shock.

As shown in Fig. 6A,B, CLP-induced septic shock led to hypotension (91.3 ± 3.8 vs 101.3 ± 1.7 mmHg in Sham, $p = 0.0789$) and tachycardia (490.8 ± 10.8 vs 419.3 ± 10.6 bpm in Sham, $p < 0.001$). NButGT supplementation restored mean arterial pressure (101.0 ± 3.6 mmHg, $p = 0.0789$ vs CLP) and reduced heart rate almost to control values (441.1 ± 8.6 bpm, $p < 0.01$ vs CLP).

CLP rats also showed an increase in respiratory rate (54.1 ± 3.0 vs 44.9 ± 1.7 rpm in Sham, $p < 0.05$), in lactatemia (3.2 ± 0.2 vs 1.1 ± 0.1 mmol/L in Sham, $p < 0.001$ vs Sham), and in creatininemia (31.0 ± 3.5 vs 22.4 ± 1.0 μ mol/L in Sham, $p < 0.01$). Interestingly, whilst NButGT didn't improve lactatemia in this model (3.6 ± 0.2 mmol/L), it did significantly improve the respiratory rate (42.8 ± 1.3 rpm, $p < 0.01$ vs CLP) and plasma creatinine levels (23.4 ± 0.9 μ mol/L, $p < 0.05$ vs CLP) (Fig. 6C–E).

O-GlcNAc stimulation improves cardiovascular function through restoration of calcium regulators but not changes in autophagy.

The evaluation of the mechanisms involved in the effects of O-GlcNAc stimulation in septic shock was only performed for the LPS rat model. In this model, RyR, SERCA and phospholamban gene expression were not modified by LPS, fluid resuscitation nor NButGT

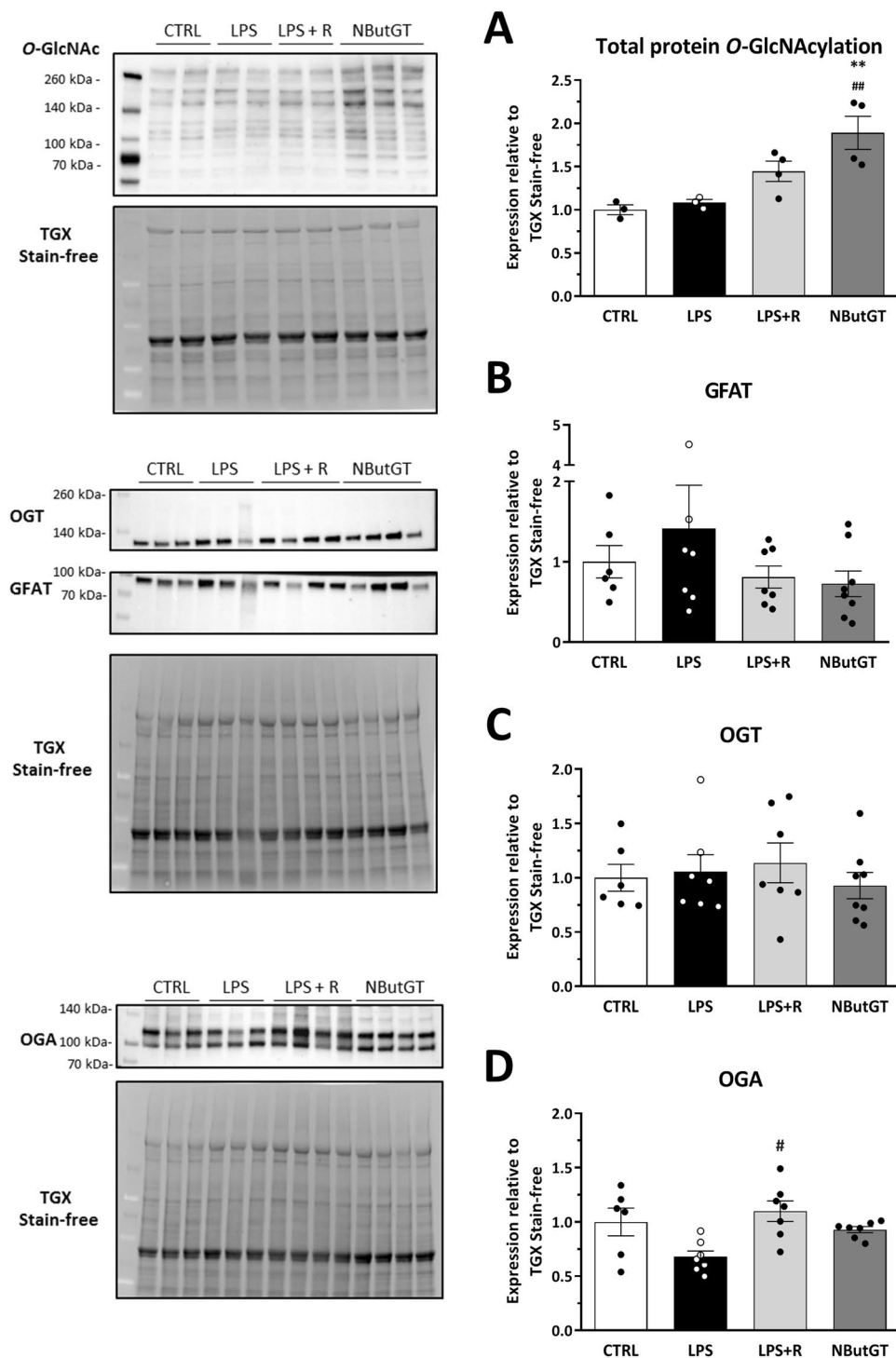


Figure 1. Impact of endotoxemic shock and O-GlcNAc stimulation were evaluated by immunoblot analysis for the major proteins involved in the hexosamine biosynthetic pathway. Heart powder protein from control, LPS, LPS+ fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS+ R+ treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg) 3 hours after shock induction were probed for total O-GlcNAc (A), GFAT (B), OGT (C) and OGA (D). Images are representative of typical immunoblots on 4–15% TGX Stain-free gels. Results are expressed as the ratio normalized to GAPDH expression. Values are mean $\pm$ SEM, ** $p < 0.01$ vs control; ## $p < 0.01$ vs LPS; determined by Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post-test.

(Fig. 7A–C). However, LPS injection did increase SERCA2a protein expression (1.0 ± 0.1 in CTRL vs 1.7 ± 0.2 in LPS, $p < 0.001$), which was not restored by fluid resuscitation (1.5 ± 0.2 , $p = 0.07$ vs control) but was impacted by NButGT treatment (0.7 ± 0.1 in NButGT, $p < 0.001$ vs LPS and $p < 0.01$ vs LPS + R) (Fig. 7E). In parallel, neither

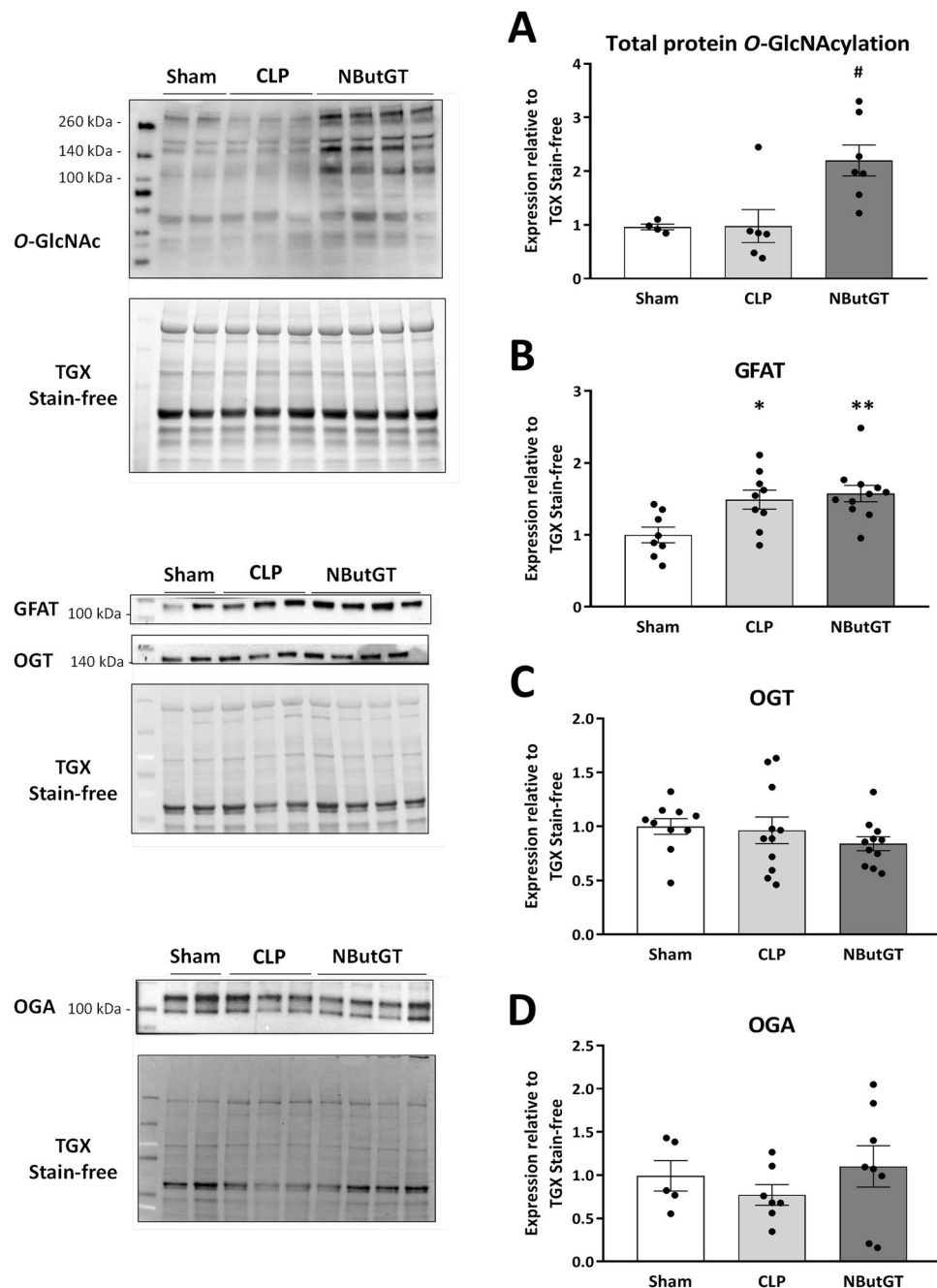


Figure 2. Impact of septic shock and O-GlcNAc stimulation were evaluated by immunoblot analysis for the major proteins involved in O-GlcNAc pathway regulation. Heart powder protein from Sham, CLP, and CLP + treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg) 24 hours after surgery were probed for total O-GlcNAc (A), GFAT (B), OGT (C) and OGA (D). Images are representative of typical immunoblots on 4–15% TGX Stain-free gels. Results are expressed as the ratio normalized to TGX Stain-free or GAPDH expression. Values are mean $\pm$ SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs Sham; [#] p < 0.05 vs CLP; determined by Kruskal–Wallis analysis and Dunn’s post-test.

LPS fluid resuscitation nor NButGT affected RyR2 expression or the active form of phospholamban (Fig. 7D–F). In this model, genes and proteins involved in autophagy were also evaluated in hearts, however these were not modified by NButGT treatment (Fig. 8).

Discussion

This study was designed to evaluate the therapeutic potential of O-GlcNAc stimulation as an early post-treatment for septic shock. Our results demonstrate that an increase in protein O-GlcNAcylation with NButGT, an inhibitor of OGA, improved global outcome of animals in two different models of septic shock. O-GlcNAc stimulation could be a valuable therapeutic strategy in clinical septic shock management.

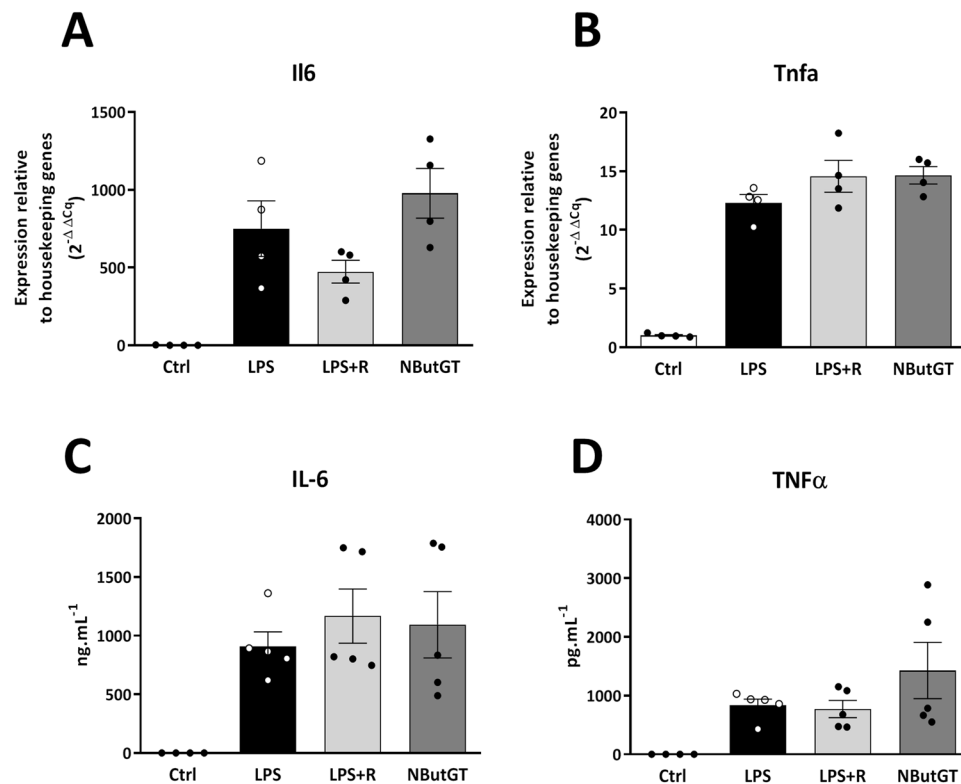


Figure 3. Measurement of inflammatory parameters. Cardiac gene expression and blood cytokine release of IL-6 (A) and TNFα (B) were evaluated by qRT-PCR and ELISA. Heart powder protein or RNA from control, LPS, LPS+ fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS+ R + treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg) 3 hours after shock induction were examined. Values are mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs control.

In this study, both LPS and CLP models produced a septic shock with organ dysfunction and metabolic perturbations seen at the plasma level (creatinine, troponin T and/or lactate), and cardiovascular dysfunction with pronounced tachycardia, low hypotension, and both systolic and diastolic dysfunction. Thus, according to the latest definition, our animals developed septic shock^{2,10}.

Increase in protein O-GlcNAcylation with NButGT is not associated with a modification of HBP enzyme expression. Results from our study are based on two models of shock, an LPS-induced model, which develops a rapid and reproducible endotoxemic shock (3 h), and a CLP model which develops a longer term poly-microbial septic shock (24 h). In these two models, septic shock leads to an increase in GFAT expression but did not modify (i) the expression of OGT and OGA, the two direct enzymes involved in O-GlcNAc level regulation and (ii) the global protein O-GlcNAcylation in cardiac tissue. NButGT administration induced an increase in global protein O-GlcNAcylation in heart tissue but had no impact on the expression of OGA, OGT and GFAT. The relationship between O-GlcNAc levels and the pathological state is not clearly identified. Whilst our results are in accordance with previous studies demonstrating that intracellular O-GlcNAc levels are modulated by stress, regulation of GFAT, OGA and OGT may take a longer. For example, significant increases in intracellular glucose concentrations did not modify GFAT gene or protein expression^{11,12}. In parallel, expression of OGT seems to be poorly sensitive to O-GlcNAc modulation^{13,14}. However, GFAT and OGT activities are regulated by UDP-GlcNAc, GlcN-6-P and O-GlcNAc moieties^{13,15–17}. *In vitro*, a long term augmentation of O-GlcNAc levels with OGT adenovirus transfection or treatment with Thiamet G (10 μM) induced an increase in OGA gene and protein expression^{14,15,18}. Collectively, these results suggest that the modulation of OGA requires a longer period of time.

Currently, *iv* fluid resuscitation in association with antibiotic therapy is the gold standard for the treatment of septic shock in patients¹⁹. As expected, in our study, fluid resuscitation with a bolus of colloid improved mean arterial pressure. However, the circulating markers of acidosis and organ dysfunction were not improved with fluid resuscitation only. Fluid resuscitation therapy has been recently discussed as it may have adverse effects on renal function²⁰, with a potential detrimental effect in the long term for patients suffering from septic shock. Results from our study suggest a new interrogation of fluid resuscitation therapy is warranted. Interestingly, the addition of NButGT to the fluid resuscitation treatment in LPS-treated rats efficiently normalized pH and bicarbonates. This therapeutic approach also normalizes circulating markers of organ function such as lactate and troponin T, and improves survival time. Moreover, we observed a significant increase in plasma creatinine levels in LPS-treated rats suggesting acute kidney injury. Treatment with NButGT normalizes this plasma creatinine level in our two models suggesting a potentially beneficial effect on renal function. Additional physiological, biochemical and histological analyses would be necessary to validate this hypothesis. In this model, NButGT also improved

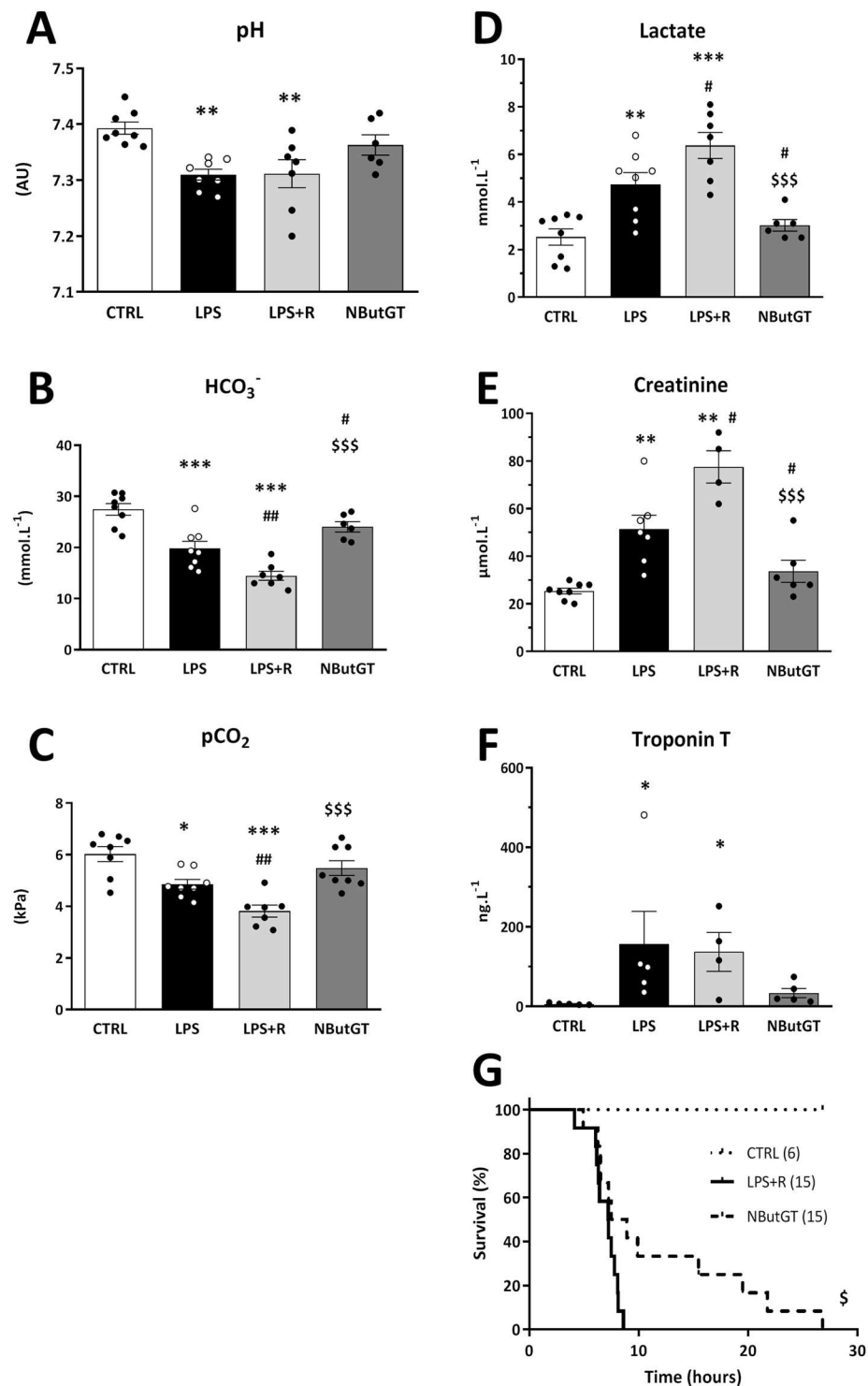


Figure 4. Circulating blood parameters were evaluated 3 hours after shock induction on CTRL, LPS, LPS+ fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS+ R + treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg). Parameters representative of homeostasis were evaluated; pH (A), bicarbonates (HCO_3^-), (B) and blood carbon dioxide partial pressure (pCO_2), (C). Lactate was used as a marker of global hypoxia (D), creatinine for kidney function evaluation (E), and troponin T as a marker of cardiac lesion (F). Mortality was evaluated over a 30 hour period following septic shock induction (G). Values presented are mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and were determined by Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post-test. Survival analysis is presented using a Kaplan-Meier curve and was evaluated using a Mantel-Cox test.

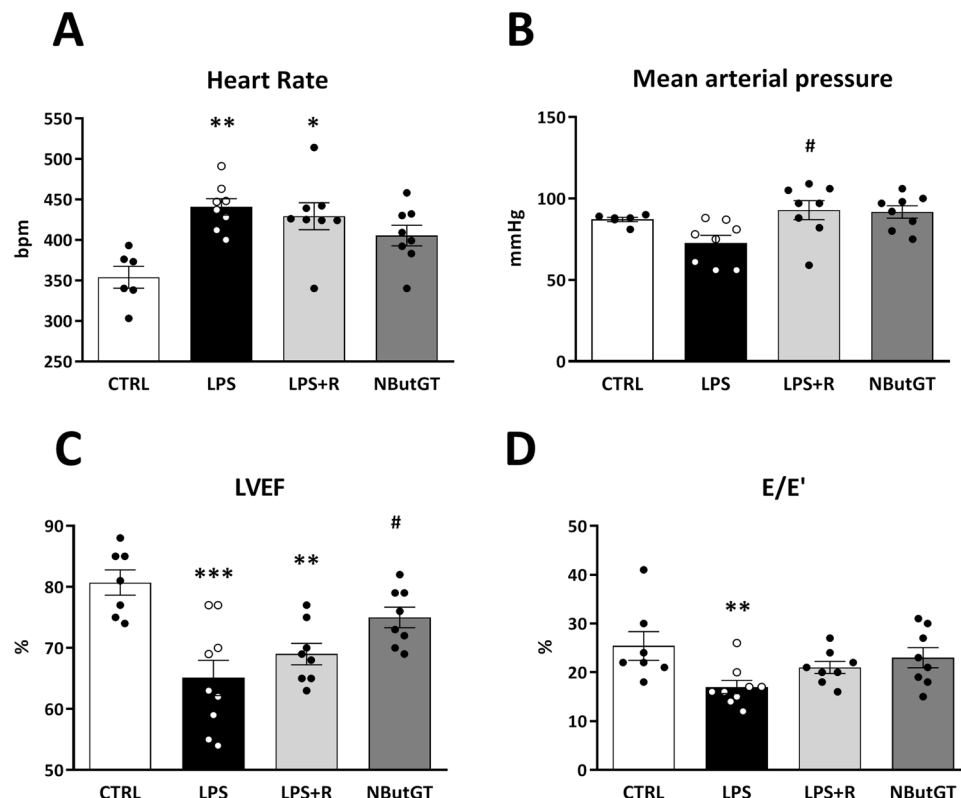


Figure 5. Heart function parameters. Heart function was evaluated *in vivo* 3 hours after shock induction on control, LPS, LPS + fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS + R + treatment with NButGT (10 mg/kg). Upper panel shows results from the invasive evaluation of heart rate (A) and mean arterial pressure (B). Bottom panel shows various echographic parameters with systolic function evaluation (C) left ventricle ejection fraction: LVEF), and diastolic function evaluation (D) the ratio between early mitral inflow velocity and mitral annular early diastolic velocity E/E'). Values are mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs LPS; determined by Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post-test.

cardiac leading to an early improvement in the animal status. The beneficial effects of NButGT were also confirmed in our CLP-induced septic shock model, whereby cardiovascular function and respiration were improved. This observation is in accordance with other studies which also demonstrated the beneficial effects of O-GlcNAc stimulation in shock. In cardiac ischemia-reperfusion, after acute renal injury or during haemorrhagic shock, O-GlcNAc stimulation (by glucosamine, PUGNAc, siRNA against OGA) improved cardiac or renal function as well as increasing animal survival^{8,21–25}. Among the mechanisms underlying these effects, the authors concluded that there were improvements in the inflammatory response, autophagy regulation and/or calcium overload.

Interestingly in our model, O-GlcNAc stimulation improves survival, circulating parameters and cardiac function without any impact on the inflammatory response. In our study, IL-6 and TNF- α were elevated 3 hours after shock induction, and treatment with fluid resuscitation with or without NButGT had no impact. Interestingly, acute increase in O-GlcNAc level at a later stage of the pathology in other models of heart failure was associated with a significant decrease in inflammatory markers⁸. In a recent study, Baudoin *et al.* defined the relationship between O-GlcNAcylation and inflammation as a 'vast territory to explore'²⁶. In fact, the role of O-GlcNAc on inflammation is controversial. In previous studies of septic shock⁹ or inflammatory models such as in trauma-haemorrhage²⁷, the authors demonstrated a reduction in plasma cytokines (IL-6 or TNF- α). Nevertheless, this elevated inflammatory response without improvement attributable to NButGT is concordant with the fact that the pro-inflammatory response begins 30 minutes after LPS injection and is maintained for at least 24 hours^{28,29}. Other studies have evaluated the impact of increased protein O-GlcNAcylation at a later stage and early NButGT treatment might have an effect at a later stage of the pathology.

Autophagy is considered as a biological quality control mechanism, and it could result in massive self-degradation or accumulation of toxic material in septic shock. Reducing autophagy has been shown to improve cardiac contractility³⁰. Based on this observation, we hypothesized that improvements observed in NButGT-treated rats could partially be explained by a modulation of autophagy. Indeed, the increase in protein O-GlcNAcylation has been shown to blunt the autophagic pathway through a decrease in Beclin-1 or LC3II protein expression^{31,32}. However, in our study there was no difference in Beclin-1 or LC3 gene or protein expression in control and LPS-treated rats. According to Sun *et al.*, the expression of these autophagic regulators depends on the time and dose of LPS administration^{33,34}. Therefore, the effect of NButGT on the autophagic pathway cannot be linked to the beneficial effect of NButGT treatment under our experimental conditions.

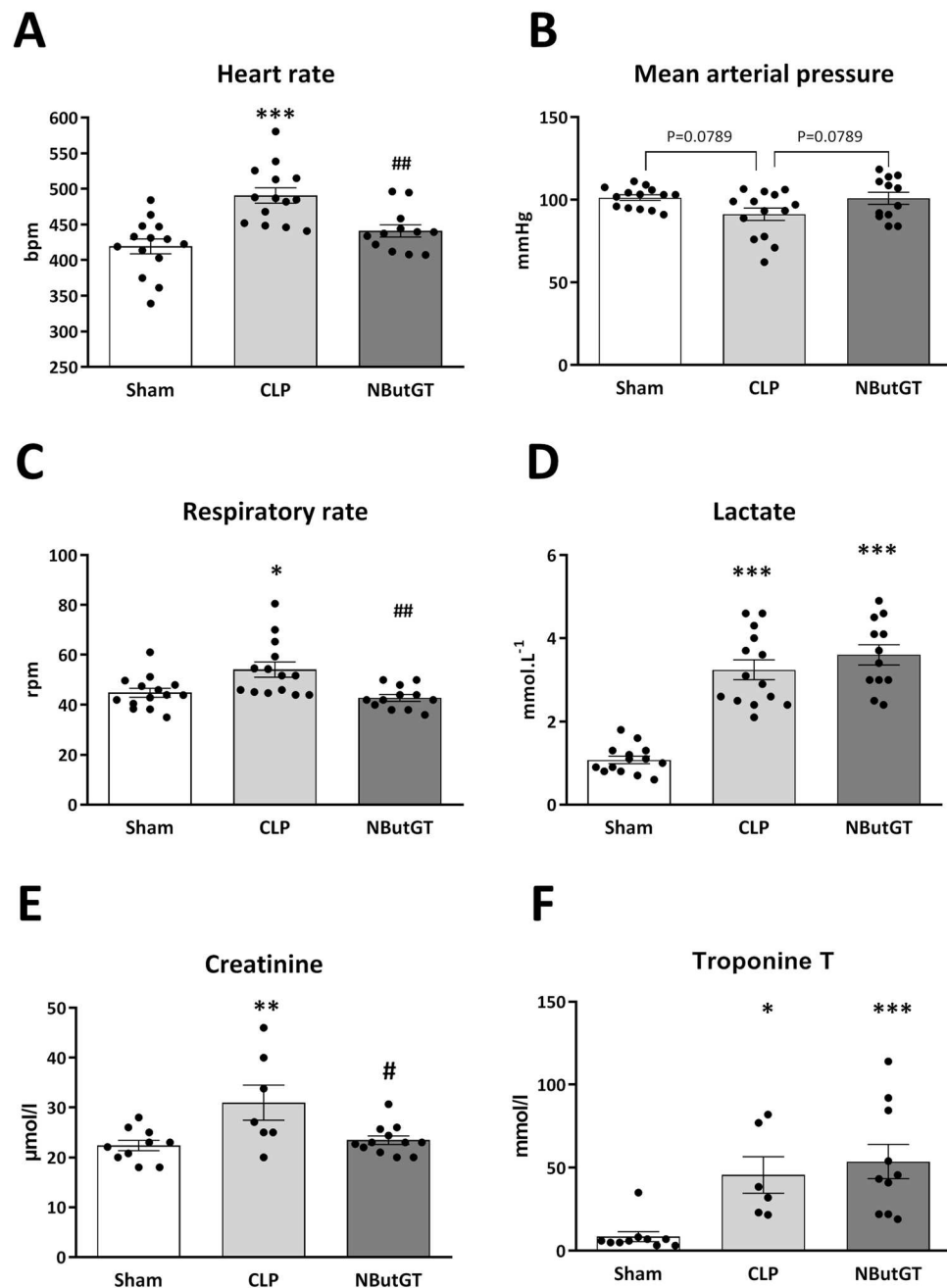


Figure 6. Measures of Global outcome. Global outcome was evaluated *in vivo* 24 hours after surgery on Sham, CLP and CLP+ treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg). Upper panel presents heart function from the invasive evaluation of (A) mean arterial pressure and (B) heart rate. Bottom panel represents (C) respiratory rate, (D) lactatemia (E) creatininemia and (F) troponin T level. Values are mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs CLP; determined using a Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test.

Cardiac improvements are also associated with improved calcium regulator expression. Considering the main role of cardiac dysfunction in the septic shock response, we investigated calcium homeostasis, a main controller of cardiac contractility, in the LPS rat model only. Whilst many studies describe an alteration of the calcium cycle at the late stage of septic shock, very few studies are available at the early phase³⁵. These studies classically show a decreased or unchanged SERCA2 function during the later phase (6–20 h after endotoxemic shock in mouse and rat models), and Morse *et al.* showed an increase in SERCA2 activity at the recovery phase of septic shock³⁶. In our study, SERCA2a was investigated at the early phase (3 h) of septic shock and SERCA2a protein levels appear to be increased. Interestingly, NButGT treatment re-established SERCA2a protein expression. We postulated that in our model, SERCA2a overexpression could be a compensatory mechanism aimed at reducing the potential cytoplasmic calcium overload observed in septic shock. In addition, analysis of calcium function of isolated cardiomyocytes was performed on a limited number of animals ($n = 4$), and are consistent with results from western

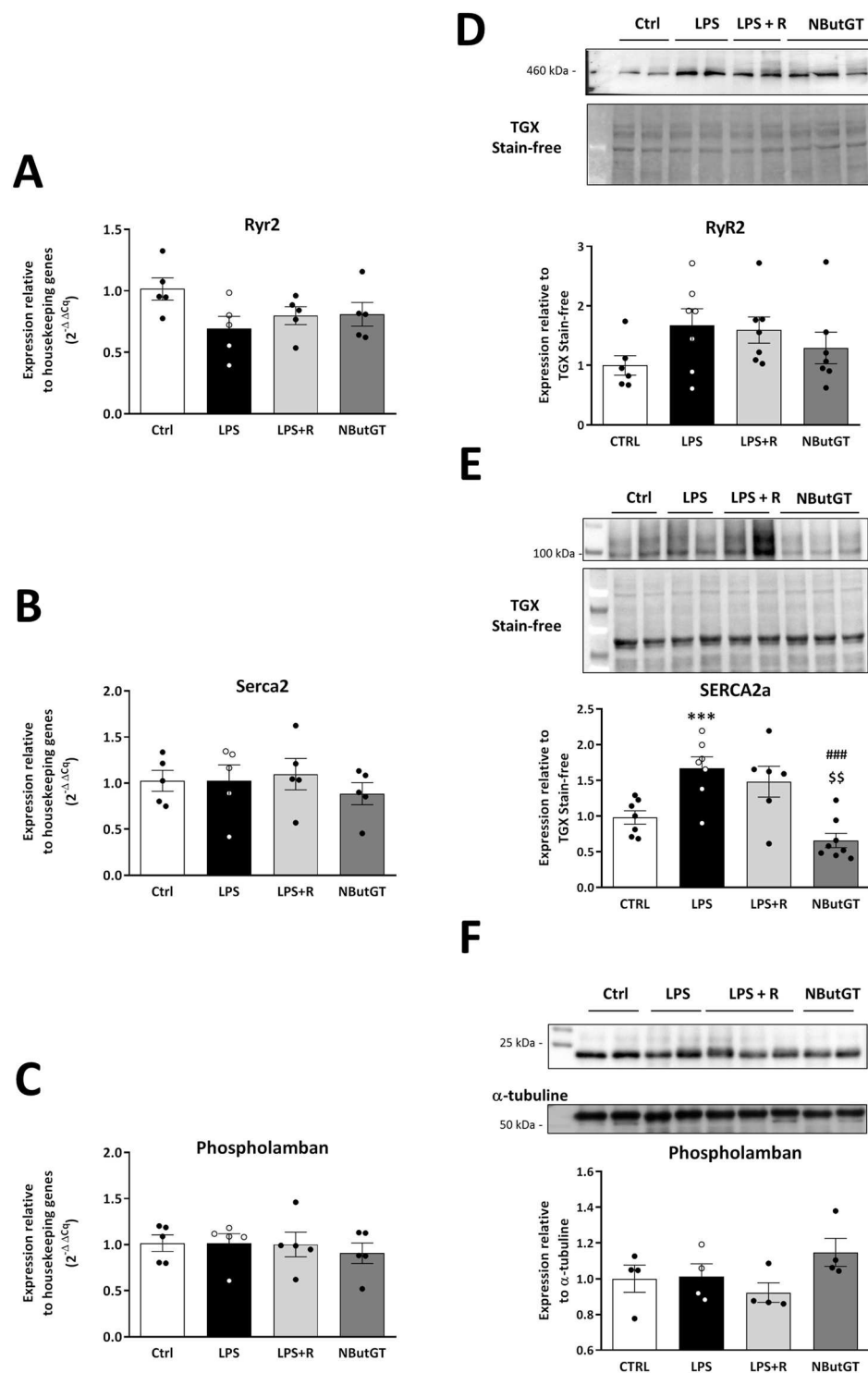


Figure 7. Regulation of Calcium homeostasis. Analysis was performed using heart powder from control, LPS, LPS+ fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS+ R+ treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg) 3 hours after shock induction. Gene expression of Ryr2 (**A**), Serca2 (**B**) and phospholamban (**C**) were evaluated by qRT-PCR. Protein expression of RyR2 (**D**), SERCA2a (**E**) and phospholamban (**F**) were evaluated by immunoblot analysis. Images are representative of typical immunoblots on 4–15% TGX Stain-free gels. Results are express as the ratio normalized to TGX Stain-free blot or α -tubulin. Values are mean $\pm$ SEM, *** p < 0.001 vs CTRL; ### p < 0.001 vs LPS; \$\$ p < 0.01 vs LPS+ R; determined by Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post-test.

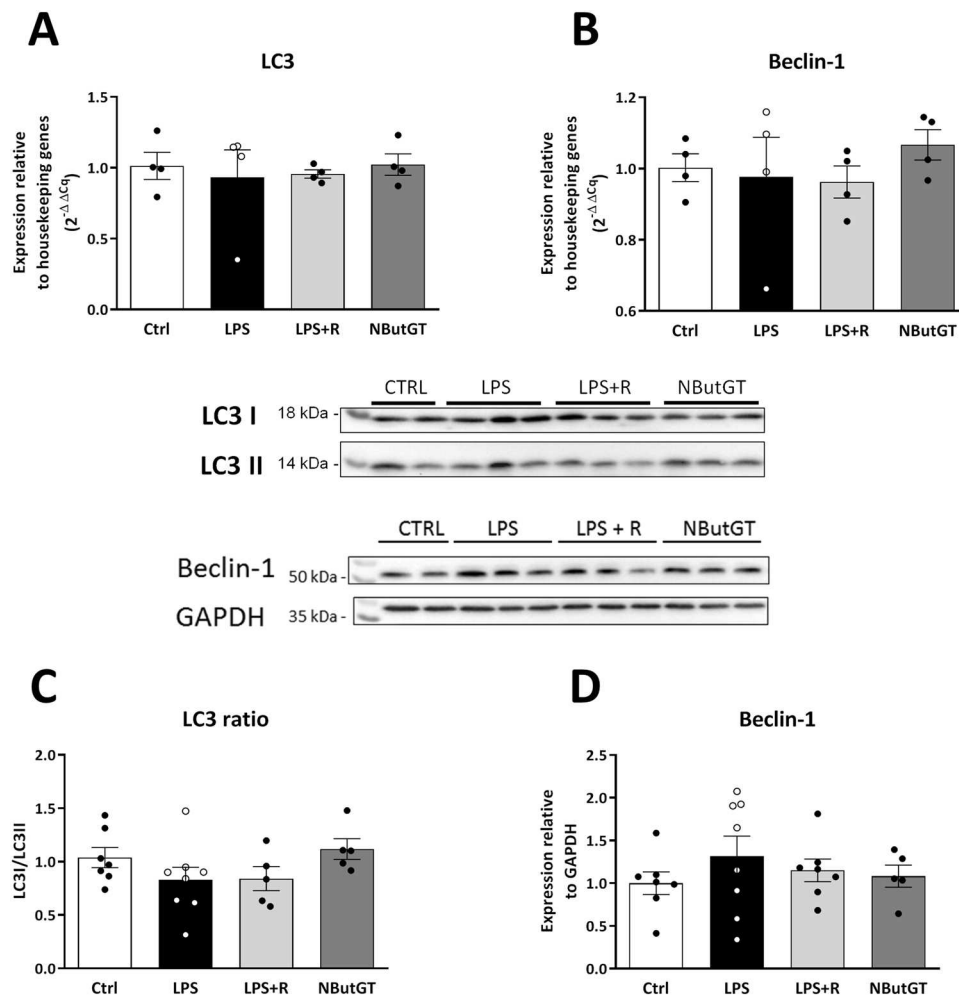


Figure 8. Regulation of Autophagy. Analysis was performed using heart powder from control, LPS, LPS+ fluid resuscitation (R: 15 ml/kg 1 hour after shock induction) and LPS+ R + treatment with NButGT (NButGT: 10 mg/kg) 3 hours after shock induction. Gene and protein expression of LC3 (A) and Beclin-1 (B) were evaluated by qRT-PCR and immunoblot analysis. Images are representative of typical immunoblots on 4–15% gels. Results are expressed as the ratio normalized to GAPDH expression. Values are mean $\pm$ SEM.

blot analysis showing a significant improvement in calcium handling in NButGT treated animal cells (data not shown). Whilst previous studies have demonstrated a potential relationship between modulation of O-GlcNAc levels and SERCA2a expression, the exact impact on SERCA2a expression remains unclear. Two studies demonstrated an absence of SERCA2a expression changes following modulation of O-GlcNAc levels^{37,38}. However, an increase in O-GlcNAc was also associated with a decrease in SERCA2a mRNA and protein expression in the context of diabetes with a modification of cardiac function^{39,40}. Moreover, while SERCA2a can be O-GlcNAcylated, the consequence on its activity remains unknown^{41,42}. The beneficial cardiovascular effects of NButGT in early septic shock management could be partially due to improved calcium homeostasis protein levels.

In summary, we demonstrate that acute O-GlcNAc stimulation by NButGT post-treatment tends to improve cardiovascular function and global outcome in two different models of septic shock. In this study, we show that this improvement is associated with the normalization of proteins involved in the calcium cycle. This pre-clinical study opens new avenues for a potential therapy of acute pathologies and especially septic shock.

Methods

Reagents. All reagents and solutions were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA) or from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NButGT was synthesized using MS methods⁴³. An NButGT dose of 10 mg/kg was determined from pilot studies as the optimal dose to achieve optimal cardiac protein O-GlcNAcylation.

Animal models. Rats were housed under standard conditions of temperature (21–24 °C), humidity (40–60%) and 12 h light/dark cycle with the light period starting at 07:00. Food and water were available *ad libitum*. Experiments were approved by the ethics committee in charge of animal experimentation, committee of the Pays de la Loire #6, (2687–2015102815445892) and performed in accordance with French law on animal welfare, EU

Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011).

Determination of the optimal dose of NButGT. Determination of the optimal dose of NButGT in healthy rats was based on the study of Macauley and Vocadlo⁴⁴. Three doses were tested in the LPS model and explored at the cardiac level by *O*-GlcNAc measurements. For all subsequent protocols in this study, the dose of 10 mg.kg⁻¹ was used.

Endotoxemic rat model. Endotoxemic shock was induced in ten-week-old male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest St, France) by intra-venous injection of lipopolysaccharide (LPS, 5 mg.kg⁻¹, LPS from *E. Coli* O111:B4, Sigma, France), and was compared to control rats (iv injection of saline). One hour later, LPS-treated rats were resuscitated with Gelofusine (B. Braun) 15 mL/kg alone (LPS+ R) or with NButGT (10 mg/kg). Three hours after LPS injection, rats were investigated for *in vivo* measurements, sacrificed and the left ventricle was collected in liquid nitrogen. Heart powder was obtained by grinding with a mortar.

To evaluate mortality, rats were observed for 30 hours after endotoxemic shock induction. During this period, animals were prematurely euthanized with a lethal dose of pentobarbital (Doletal[®], Vetoquinol, Paris, France) if they met specific criteria: incapacity to move, *decubitus* position, difficulty in breathing.

Cecal ligation and puncture rat model. Cecal ligation and puncture (CLP) surgery was performed on ten-week-old male Wistar rats (*Charles River* Ecully, France) by a modified protocol published by Rittirsch *et al.*⁴⁵. Rats were anaesthetized with a gas-mixture of 1% isoflurane (Forene[®], Abbott France, Rungis, France) in O₂. Two ligations were performed. The first-one was just under the ileo-cecal valve (100% of cecum length) to avoid ligation of the ileo-cecal artery, and so as to initiate a massive necrosis. The second one was located at the distal part of the cecum (20% of length) and included the artery in order to produce necrosis. Between these two ligations, a single puncture was performed using a 16-G needle. Exactly 0.1 mL of faeces was withdrawn and then distributed in the abdominal cavity. Sham rats were anaesthetized and underwent the laparotomy without cecal ligation and puncture. All animals received buprenorphine treatment (10 µg/kg⁻¹, subcutaneously, Buprecare[®], Med'Vet, France) before surgery and 8 h post-surgery. CLP rats also received 10 mL/kg⁻¹ of saline subcutaneously for fluid resuscitation after surgery, and 8 and 22 h post-CLP, supplemented, or not, with NButGT treatment at 10 mg/kg⁻¹. Twenty-four hours after surgery, rats were investigated for *in vivo* pressure measurements, sacrificed, and the heart and blood collected for biochemical analysis.

***In vivo* cardiovascular evaluation.** Three hours after LPS or saline injection, animals were anesthetized with 2% volume of isoflurane and 1 L.min⁻¹ O₂ to limit hemodynamic repercussion. Transthoracic echocardiography was performed using an ultrasound system VIVID7 (*GE Healthcare*, Horton, Norway) equipped with a 10 MHz sectorial probe as previously described³⁹. Measurements were made on five cardiac cycles and averaged for each data value.

Pressure measurements were performed through the right carotid artery to evaluate the mean arterial pressure signals and heart rate. The right carotid artery was isolated, ligated at the proximal end and a 2 F microtip pressure catheter was inserted (*Millar instruments Inc*, Houston, Texas). Pressure signal and heart rate were recorded using an A/D converter (*EMKA Technologies*, Paris, France) stored and displayed on a computer by the IOX1.5.7 Software System (*EMKA Technologies*). Thereafter, blood and left ventricles were collected for biological and biochemical analysis.

Blood analyses. Blood gas parameters from arterial samples were analyzed using a Gem Premier 3000 blood gas, Instrumentation Laboratory Werfen, Le Pré Saint Gervais, FRANCE. Lactate was also measured on venous blood samples using the Nova StatStrip[®] Lactate Point-of-Care, Nova Biomedical, Rungis, France. Serum creatinine was measured by an enzymatic method using creatininase and troponine T Hs measured using immuno-chemiluminescence on a Cobas 6000 Ce analyzer, Roche, Meylan, France

qPCR and western blotting analysis. Quantitative RT-PCR was performed as previously described⁴⁰ using SYBR green (StepOnePlus, Thermo Fisher). For each tissue, reverse-transcribed total RNA samples were quantified in triplicate for gene expression. Expression was normalised against the *Ywhaz* and *Gapdh* house-keeping genes (from a pool of GeNorm-defined genes) and is expressed using the ddCt method. Primers for the genes measured in this study were: *Ywhaz* (Fwd AGCGAGGGACATCTGCAAC, Rev CTTTGCTTTCTGGCTGCGAA), *Gapdh* (Fwd TTGTGCAGTGCCAGCCTC, Rev TGAACCTGCCCCTGGGTAGAG), *Phospholamban* (Fwd GGGTTTGACCAGCAAGCAAG, Rev AGCACAGCTGTCTGGTTTGT), *Serca* (Fwd GTGGAACCTTTGCCACTCATT, Rev AGCACAAAGGGCCAGGAAAT), *Ryr* (Fwd TCCTGTGCTGAGGCACTGAT, Rev CTCCATGACCC TCAGGGGA), *Lc3* (Fwd GCCCCACCCCTGAAAGG, Rev AATGACCACAAAGATCCACATACCAT), *Beclin* (Fwd TGGAGTCCCTGACAGACAAATCT, Rev ACCGCAAACCCAGAA), *Il6* (Fwd CCACCAGGAACG AAAGTCAAC, Rev TTGCGGAGAGAACTTCATAGCT); *Tnfa* (Fwd TGCCATTTTCATACCAGGAGAAAGT, Rev CTTAGGGCAAGGGCTCTTGA).

Western blotting experiments were performed on LV tissue samples as previously described⁴⁶, with extraction in the presence of 10 µM NButGT in T-PER buffer (Thermo Scientific). Proteins were evaluated using the following antibodies: GFAT (Thermo Scientific, 1858781), OGT (Sigma, O-6139), OGA (Abcam, 105217), RyR2 (Abcam, 2868), SERCA2a (Abcam, 2817), Phospholamban (Abcam, 2865), *O*-GlcNAc (Thermo Scientific, 24565), and α -tubulin (Sigma, T9026).

Data and statistical analysis. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of n experiments. If the distribution of the samples respected a Gaussian law, then the comparison of parameters was performed using a one-way ANOVA, otherwise the comparison was performed using a Kruskal-Wallis test. Either test was then analysed using a post hoc Dunn's test (GraphPad Prism 8). A P value < 0.05 was considered statistically significant. Survival analysis is presented using a Kaplan-Meier survival curve and was evaluated using a Mantel-Cox test.

Received: 7 May 2019; Accepted: 21 November 2019;

Published online: 10 December 2019

References

- Daniels, R. Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). *J. Antimicrob. Chemother.* **66**(Suppl 2), ii11–23 (2011).
- Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
- Parker, M. M. *et al.* Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann. Intern. Med.* **100**, 483–490 (1984).
- Rudiger, A. & Singer, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Critical Care Medicine* **35**, 1599–1608 (2007).
- da Silva Ramos, F. J. & Azevedo, L. C. P. Hemodynamic and perfusion end points for volemic resuscitation in sepsis. *Shock* **34**(Suppl 1), 34–39 (2010).
- Torres, C. R. & Hart, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308–3317 (1984).
- Ferron, M., Denis, M., Persello, A., Rathagirisnan, R. & Lauzier, B. Protein O-GlcNAcylation in Cardiac Pathologies: Past, Present, Future. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 819 (2018).
- Nöt, L. G., Brocks, C. A., Várhidy, L., Marchase, R. B. & Chatham, J. C. Increased O-linked beta-N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. *Crit. Care Med.* **38**, 562–571 (2010).
- Hwang, J.-S. *et al.* Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation. *J. Biol. Chem.* **294**, 608–622 (2019).
- Zaky, A., Deem, S., Bendjelid, K. & Treggiari, M. M. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. *Shock* **41**, 12–24 (2014).
- Paterson, A. J. & Kudlow, J. E. Regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene transcription by epidermal growth factor and glucose. *Endocrinology* **136**, 2809–2816 (1995).
- Robinson, K. A., Weinstein, M. L., Lindenmayer, G. E. & Buse, M. G. Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes* **44**, 1438–1446 (1995).
- Yehezkel, G., Cohen, L., Kliger, A., Manor, E. & Khalaila, I. O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J. Biol. Chem.* **287**, 28755–28769 (2012).
- Zhang, Z., Tan, E. P., VandenHull, N. J., Peterson, K. R. & Slawson, C. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 206 (2014).
- Slawson, C. *et al.* Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 32944–32956 (2005).
- Graack, H. R., Cinque, U. & Kress, H. Functional regulation of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFAT1) of *Drosophila melanogaster* in a UDP-N-acetylglucosamine and cAMP-dependent manner. *Biochem. J.* **360**, 401–412 (2001).
- DeHaven, J. E., Robinson, K. A., Nelson, B. A. & Buse, M. G. A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes* **50**, 2419–2424 (2001).
- Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S. & Hart, G. W. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4130–4140 (2008).
- Cawcutt, K. A. & Peters, S. G. Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 1572–1578 (2014).
- Mårtensson, J. & Bellomo, R. Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Crit Care Clin* **31**, 649–660 (2015).
- Champattanachai, V., Marchase, R. B. & Chatham, J. C. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C178–187 (2007).
- Ngoh, G. A., Watson, L. J., Facundo, H. T. & Jones, S. P. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* **40**, 895–911 (2011).
- Hu, J. *et al.* Augmented O-GlcNAc signaling via glucosamine attenuates oxidative stress and apoptosis following contrast-induced acute kidney injury in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **103**, 121–132 (2017).
- Suh, H. N., Lee, Y. J., Kim, M. O., Ryu, J. M. & Han, H. J. Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells. *J. Cell. Physiol.* **229**, 1557–1568 (2014).
- Nöt, L. G., Marchase, R. B., Fülöp, N., Brocks, C. A. & Chatham, J. C. Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats. *Shock* **28**, 345–352 (2007).
- Baudoin, L. & Issad, T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 235 (2014).
- Nöt, L. G., Brocks, C. A., Várhidy, L., Marchase, R. B. & Chatham, J. C. Increased O-linked β -N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. *Crit Care Med* **38**, 562–571 (2010).
- Ertel, W., Morrison, M. H., Ayala, A. & Chaudry, I. H. Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am. J. Physiol.* **269**, R160–166 (1995).
- Keel, M. *et al.* Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *J Trauma* **41**, 430–437; discussion 437–438 (1996).
- Turdi, S. *et al.* Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1327–1338 (2012).
- Marsh, S. A., Powell, P. C., Dell'Italia, L. J. & Chatham, J. C. Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life Sci.* **92**, 648–656 (2013).
- Wani, W. Y. *et al.* O-GlcNAc regulation of autophagy and α -synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Mol Brain* **10**, 32 (2017).
- Sun, Y. *et al.* Beclin-1-Dependent Autophagy Protects the Heart During Sepsis. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032821> (2018).
- Sun, Y., Cai, Y. & Zang, Q. S. Cardiac Autophagy in Sepsis. *Cells* **8** (2019).
- Hobai, I. A., Edgecomb, J., LaBarge, K. & Colucci, W. S. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. *Shock* **43**, 3–15 (2015).

36. Morse, J. C. *et al.* Up-regulation of Intracellular Calcium Handling Underlies the Recovery of Endotoxemic Cardiomyopathy in Mice. *Anesthesiology* **126**, 1125–1138 (2017).
37. Yokoe, S. *et al.* Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy. *Glycobiology* **20**, 1217–1226 (2010).
38. Zhu, W., El-Nachef, D., Yang, X., Ledee, D. & Olson, A. K. O-GlcNAc Transferase Promotes Compensated Cardiac Function and Protein Kinase A O-GlcNAcylation During Early and Established Pathological Hypertrophy From Pressure Overload. *J Am Heart Assoc* **8** (2019).
39. Clark, R. J. *et al.* Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 44230–44237 (2003).
40. Hu, Y. *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circ. Res.* **96**, 1006–1013 (2005).
41. Johnsen, V. L. *et al.* Enhanced cardiac protein glycosylation (O-GlcNAc) of selected mitochondrial proteins in rats artificially selected for low running capacity. *Physiol. Genomics* **45**, 17–25 (2013).
42. Fricovsky, E. S. *et al.* Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **303**, R689–699 (2012).
43. Macauley, M. S., Whitworth, G. E., Debowski, A. W., Chin, D. & Vocadlo, D. J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J. Biol. Chem.* **280**, 25313–25322 (2005).
44. Macauley, M. S. & Vocadlo, D. J. Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 107–121 (2010).
45. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* **4**, 31–36 (2009).
46. Merlet, N. *et al.* Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS ONE* **8**, e64711 (2013).

Acknowledgements

We thank the IBISA core facility Therassay for its assistance and their technical support and Dr Bryce van Denderen for editing. This work was supported by “Société Française d’Anesthésie et de Réanimation” (Paris, France), “Fondation d’entreprises Genavie” (Nantes, France), “Fédération Française de Cardiologie” (Paris, France) and Baxter Healthcare Corporation (Deerfield, USA).

Author contributions

M.F. performed most of the experimental work; J.C., V.P. performed echocardiographic and hemodynamic measurements; J.C., A.P., M.D., A.E., V.A. assisted with the experimental work; M.M. performed NBut G.T. synthesis; E.B. performed plasmatic biochemical evaluations; J.C.C. participated in the study conception; C.G., B.R., B.L. participated in study conception and design as well as data analysis and interpretation; M.F., C.G., B.R., B.L. drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Overexpression of endothelial β_3 -adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats

Justine Dhot^{1†}, Marine Ferron^{1†}, Valentine Prat^{1†}, Antoine Persello¹, David Roul¹, David Stévant¹, Damien Guijarro¹, Nicolas Piriou¹, Virginie Aillerie¹, Angélique Erraud¹, Gilles Toumaniantz¹, Morteza Erfanian¹, Angela Tesse¹, Amandine Grabherr¹, Laurent Tesson^{2,3}, Séverine Menoret^{2,3,4}, Ignacio Anegón^{2,3}, Jean-Noël Trochu¹, Marja Steenman¹, Michel De Waard^{1,5}, Bertrand Rozec¹, Benjamin Lauzier^{1*,‡} and Chantal Gauthier^{1†}

¹Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France; ²Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; ³Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; ⁴CNRS, SFR de Nantes, Nantes, France; ⁵LabEx 'Ion Channels, Science & Therapeutics', Nice, France

Abstract

Aims Diastolic dysfunction is common in cardiovascular diseases, particularly in the case of heart failure with preserved ejection fraction. The challenge is to develop adequate animal models to envision human therapies in the future. It has been hypothesized that this diastolic dysfunction is linked to alterations in the nitric oxide (NO) pathway. To investigate this issue further, we investigated the cardiac functions of a transgenic rat model ($\text{Tg}\beta_3$) that overexpresses the human β_3 -adrenoceptor ($\text{h}\beta_3\text{-AR}$) in the endothelium with the underlying rationale that the NO pathway should be stimulated in the endothelium.

Methods and results Transgenic rats ($\text{Tg}\beta_3$) that express $\text{h}\beta_3\text{-AR}$ under the control of intercellular adhesion molecule 2 promoter were developed for a specific expression in endothelial cells. Transcriptomic analyses were performed on left ventricular tissue from 45-week-old rats. Among all altered genes, we focus on NO synthase expression and endothelial function with arterial reactivity and evaluation of NO and $\text{O}_2^{\bullet-}$ production. Cardiac function was characterized by echocardiography, invasive haemodynamic studies, and working heart studies. Transcriptome analyses illustrate that several key genes are regulated by the $\text{h}\beta_3\text{-AR}$ overexpression. Overexpression of $\text{h}\beta_3\text{-AR}$ leads to a reduction of *Nos3* mRNA expression (-72% ; $P < 0.05$) associated with a decrease in protein expression (-19% ; $P < 0.05$). Concentration-dependent vasodilation to isoproterenol was significantly reduced in $\text{Tg}\beta_3$ aorta (-10% ; $P < 0.05$), while NO and $\text{O}_2^{\bullet-}$ production was increased. In the same time, $\text{Tg}\beta_3$ rats display progressively increasing diastolic dysfunction with age, as shown by an increase in the E/A filing ratio [1.15 ± 0.01 (wild type, WT) vs. 1.33 ± 0.04 ($\text{Tg}\beta_3$); $P < 0.05$] and in left ventricular end-diastolic pressure [5.57 ± 1.23 mmHg (WT) vs. 11.68 ± 1.11 mmHg ($\text{Tg}\beta_3$); $P < 0.05$]. In isolated working hearts, diastolic stress using increasing preload levels led to a 20% decrease in aortic flow [55.4 ± 1.9 mL/min (WT) vs. 45.8 ± 2.5 mL/min ($\text{Tg}\beta_3$); $P < 0.05$].

Conclusions The $\text{Tg}\beta_3$ rat model displays the expected increase in NO production upon ageing and develops diastolic dysfunction. These findings provide a further link between endothelial and cardiac dysfunction. This rat model should be valuable for future preclinical evaluation of candidate drugs aimed at correcting diastolic dysfunction.

Keywords Diastolic dysfunction; Endothelium; Nitric oxide production; HFpEF; Transcriptome; β_3 -Adrenoceptor; Rat model

Received: 19 May 2020; Revised: 31 August 2020; Accepted: 15 September 2020

*Correspondence to: Benjamin Lauzier, Université de Nantes, l'institut du thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, IRS-UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33 2 28 08 01 57. Email: benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

[‡]These authors co-directed this work.

Introduction

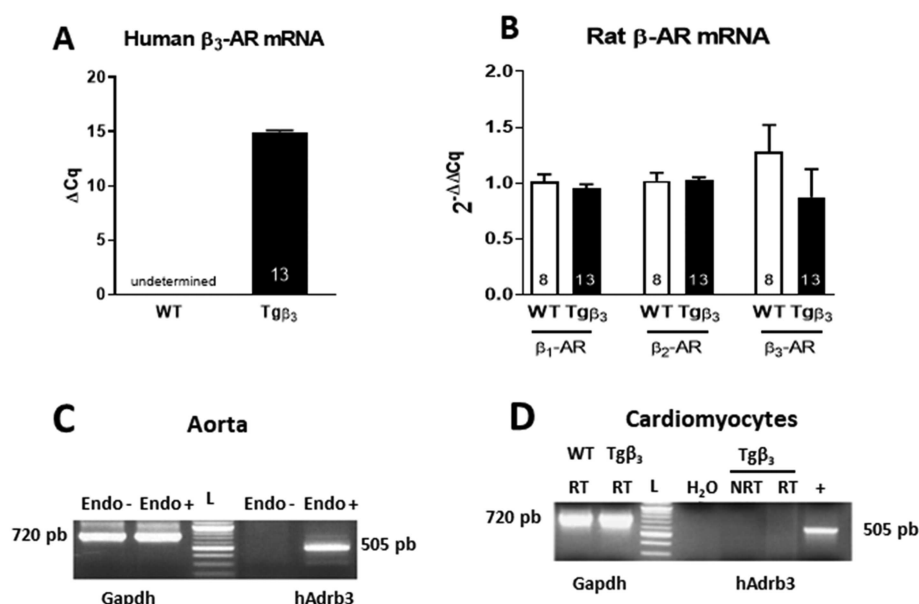
The high prevalence, mortality, and health costs associated with heart failure (HF) make it a major public health issue. Several terminologies exist to classify patients with HF according to their ejection fraction (EF).^{1,2} At present, patients with HF with preserved EF (HFpEF) are more difficult to manage clinically due to the complexity of the phenotypes underlying this pathology. Indeed, several co-morbidities are described in HFpEF patients, such as high blood pressure, obesity, diabetes, atrial fibrillation, ageing, and the influence of gender on the disease, all of which complicate diagnosis and the identification of effective therapeutic targets.³ The common feature of all HFpEF phenotypes is diastolic dysfunction with altered relaxation and increased filling pressures.⁴ The early phase of diastolic dysfunction is generally asymptomatic. When patients become symptomatic, they show a decrease in their tolerance to exercise or to stress conditions leading to cardiac decompensation.⁵ Because HFpEF remains a poorly understood pathology with no treatment to improve patient survival, it is important to develop animal models that best recapitulate the human phenotypes. Such HFpEF models may in turn help understand how diastolic dysfunction is generated over time within this pathology and provides hope for accelerated drug discovery. Basic and clinical studies have highlighted that the endothelium plays a role in the pathophysiology of HFpEF and the observed diastolic dysfunction.^{6,7} Endothelial cells may be a key factor in the development of the diastolic dysfunction with a significant involvement of nitric oxide (*NO) and *NO synthase (NOS).

Indeed, Schiattarella *et al.* showed that an increase in iNOS activity and expression can drive the diastolic dysfunction of HFpEF through an increase in *NO production.⁸ Considering the fact that *NO production is mainly due to $\text{G}\alpha\text{i}$ -*NO-cGMP activation and that this pathway is coupled to the expression and activity of β_3 -adrenergic receptors (β_3 -AR),^{9,10} we decided to investigate how overexpression of this receptor in the endothelium may influence *NO production and whether it may lead to a new and original model of HFpEF. For that purpose, we have generated a rat model overexpressing the human β_3 -AR (h β_3 -AR) within endothelial cells (Tg β_3), and we evaluated how it impacted *NO production and myocardial function. We demonstrate that the excessive *NO production is indeed associated with a progressive alteration of diastolic function upon ageing.

Materials and methods

All animal experimental protocols were approved by the Pays de la Loire Ethical Committee and were performed in accordance with the French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Pub. No. 85-23, revised 2011), and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. In functional protocols, both male and female animals were investigated. All experimental procedures performed are available in detail in the Supporting Information.

Figure 1 β -Adrenergic receptor transcript expression. Transcript levels of h β_3 -AR mRNA (A) and rat β_1 -AR, β_2 -AR, and β_3 -AR mRNA (B), in wild-type (WT) ($n = 8$) and Tg β_3 ($n = 13$) rats. Reverse transcription PCR assays were performed on whole heart, and de-endothelialized or intact aorta tissue extracts (C), and isolated cardiomyocytes (D). hAdrb3, human β_3 -AR. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, * $P < 0.05$.



Results

Rat model overexpressing human β_3 -adrenoceptor in endothelial cells

To confirm cardiac $h\beta_3$ -AR expression in our model, quantitative reverse transcription PCR analyses were conducted on whole-heart extract samples. Our assays showed a high level of $h\beta_3$ -AR mRNA in Tg β_3 whole-heart samples (*Figure 1A*). Expression of the transgene did not impact the expression of endogenous β_1 -AR, β_2 -AR, and β_3 -AR (*Figure 1B*). To confirm endothelial expression of the inserted gene, reverse transcription PCR was performed on aortas and isolated cardiomyocytes. The presence of $h\beta_3$ -AR transcripts was confirmed in entire Tg β_3 aortas (*Figure 1C*), while it was not detected in wild-type (WT) aortic tissue nor in the aortas of Tg β_3 rats in which the endothelium was removed. Conversely, $h\beta_3$ -AR transcripts were absent in isolated cardiomyocytes (*Figure 1D*), confirming that $h\beta_3$ -AR mRNA could be expressed in the endothelial cells of Tg β_3 rats, but further study should be performed to confirm. These results agree with the use of the intercellular adhesion molecule 2 promoter that should restrict expression to the endothelium. Analyses of protein expression levels using a β_3 -AR-specific antibody illustrate that protein expression increased over time between 15 and 45 weeks of age (Supporting Information, *Figure S1*). Like many others, this antibody does not distinguish between the rat and human isoforms of β_3 -AR, but it is reasonable to assume that the increased level of protein expression is due to the transgene.

Transcriptomic analyses of transgenic rats

In order to investigate the impact of $h\beta_3$ -AR overexpression in the endothelium on cardiac gene expression, we turned towards transcriptomic analyses. Using significance analysis of microarrays with false discovery rate = 0.05, we identified 241 transcripts that were differentially expressed in Tg β_3 rats compared with WT rats (Supporting Information, '45wk males differential'). Among these genes, 15 of them were up-regulated, whereas 226 other ones were down-regulated (*Figure 2A*). The data indicate an up-regulation of several transcripts involved in collagen formation and in the regulation of the metabolism in Tg β_3 rats. The main down-regulated transcripts were involved in the reactive oxygen pathway and the immune system. Further analyses of the data by gene set enrichment analysis underlined these findings: when using all gene sets as input, 49 gene sets were significantly up-regulated in Tg β_3 rats and 78 gene sets were significantly down-regulated. Most of the up-regulated gene sets were associated with the extracellular matrix, indicating an activation of fibrotic pathways in the transgenic rats (*Figure 2B* and *2C*) that display the most significant gene sets. To focus on the

*NO pathway, gene set enrichment analysis was also performed on endothelial NOS (eNOS)-associated and inducible NOS (iNOS)-associated gene sets only. When analysing eNOS-associated gene sets, a positive association was found with the CHEN_LVAD_OF_FAILING_FAILING_HEART_UP gene set (*Figure 2D*). Although this gene set does not contain eNOS, eNOS was found to be up-regulated in the corresponding study.¹¹ Analysis of iNOS-associated gene sets pointed towards the implication of reactive oxygen biosynthesis (*Figure 2E*). We decided to perform a more in-depth analysis of the eNOS pathways in this animal model.

Transgenic rats display a dysfunction in endothelial nitric oxide synthase pathways

Imbalance in nitric oxide synthase pathway

To investigate the potential physiopathological mechanism involved in our model, mRNA analyses of neuronal NOS (nNOS) (Nos1) and iNOS (Nos2) were performed on WT and Tg β_3 rats on the left ventricle. The analysis shows no significant alteration concerning the mRNA levels for Nos1 and Nos2 (*Figure 3A* and *3B*), but we detected a significant decrease in eNOS (Nos3) mRNA expression in Tg β_3 rats (*Figure 3C*). Interestingly, the protein levels of nNOS and iNOS were significantly increased in Tg β_3 rats (*Figure 3D* and *3E*). In contrast, the eNOS levels were decreased (*Figure 3F*), without an alteration of the phosphorylation level of eNOS (*Figure 3G*). We conclude that overexpression of $h\beta_3$ -AR should lead to a significant imbalance in NOS pathways.

Impairment of nitric oxide production and endothelial dysfunction

To confirm a possible endothelial dysfunction linked to these changes in NOS expression levels, we investigated the vascular function in response to aortic isoproterenol in Tg β_3 animals. We found that the response to isoproterenol was reduced in Tg β_3 animals (*Figure 4A*). This decrease in vasorelaxation is counterintuitively related to an increase in *NO and $O_2^{\cdot-}$ productions in these aortas (*Figure 4B* and *4C*), suggesting that the balance of expression of NOS subtypes in the endothelium plays an important role.

All these contextual findings, at both the transcriptome and protein levels, represented strong incentives to carefully investigate potential cardiac pathologies in this rat model.

Transgenic rats develop a phenotype similar to age-related diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction models

General characteristics

To examine the impact of the overexpression of $h\beta_3$ -AR in the endothelium on the rat cardiac phenotype, echocardiography

Figure 2 Transcriptome analysis on the left ventricle. Hierarchical clustering of microarray data based on the 241 transcripts differentially expressed between Tgβ₃ and wild-type (WT) rats (A). Gene expression is presented as a coloured matrix, where each row represents a gene and each column represents a sample. Green, black, and red correspond to lower values, median values, and higher values, respectively. (B–E) Gene set enrichment analysis enrichment plots and heat maps based on gene expression profiles from Tgβ₃ and WT rats. Only genes from the gene set enrichment analysis core enrichment are displayed in the heat maps.

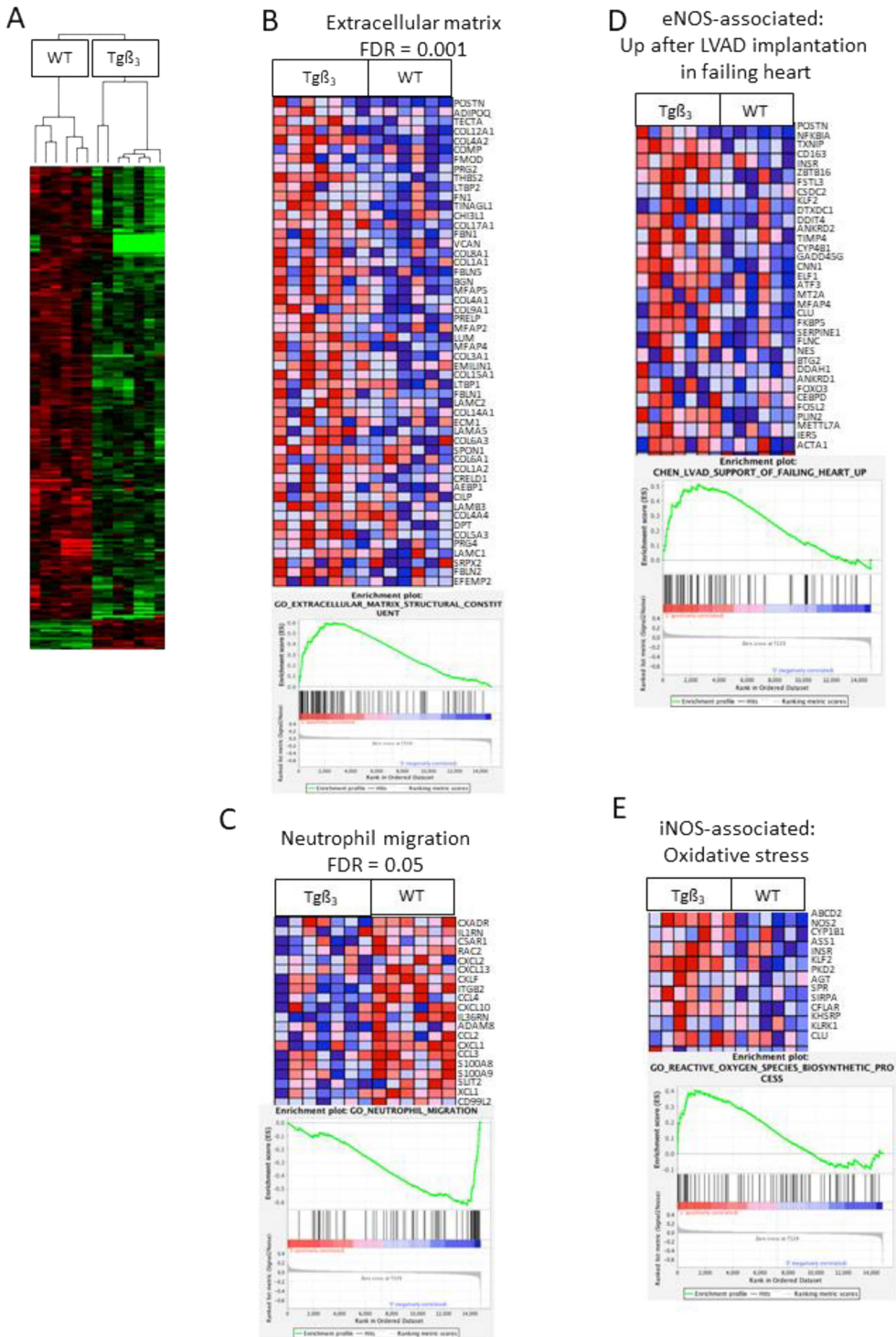
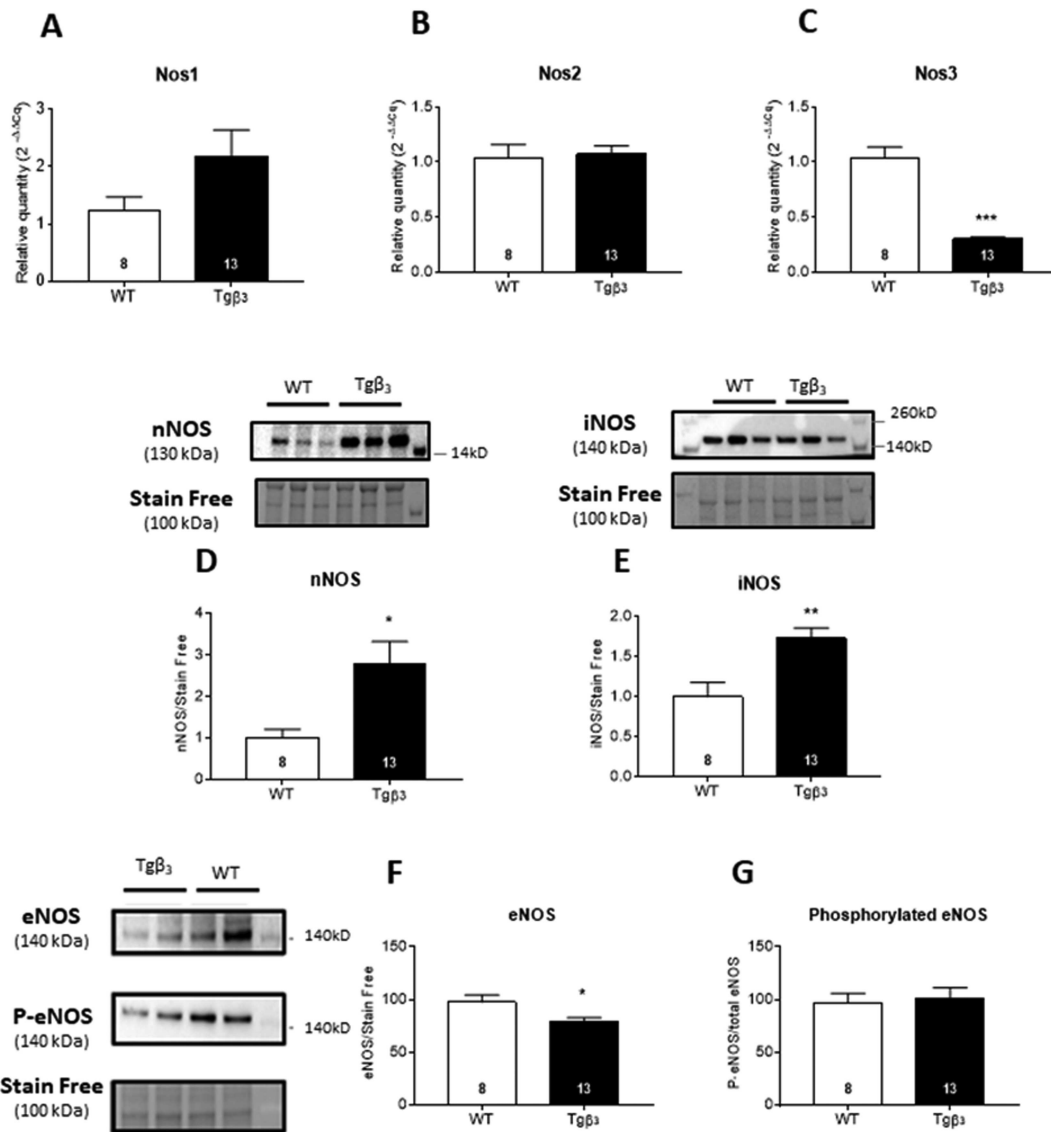


Figure 3 Changes in NOS transcripts and protein expression and phosphorylation on the left ventricle. nNOS (Nos1) (A), iNOS (Nos2) (B), and nNOS (Nos3) (C) mRNA levels in wild-type (WT) ($n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($n = 13$) rats. Western blot analysis was performed to study total expression of nNOS (D), iNOS (E), and eNOS (F) and level of phosphorylated Ser1177 eNOS (G). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$.



was performed at 15, 30, and 45 weeks of age. This investigation was performed on animals of both sexes, as well as on WT animals. We also investigated ovariectomized (OVX) female rats. We observed that WT and $Tg\beta_3$ female rats—either OVX or non-OVX—display no alteration in their cardiac function during ageing (Supporting Information, *Tables S3* and *S4* and *Figure S2*). In contrast, $Tg\beta_3$ male rats do show a diastolic dysfunction that develops during ageing and that persists. Because of this sex difference in the manifestation of cardiac defects, we decided to focus our attention on male animals. Therefore, only data from male WT and $Tg\beta_3$ rats will be presented in this manuscript.

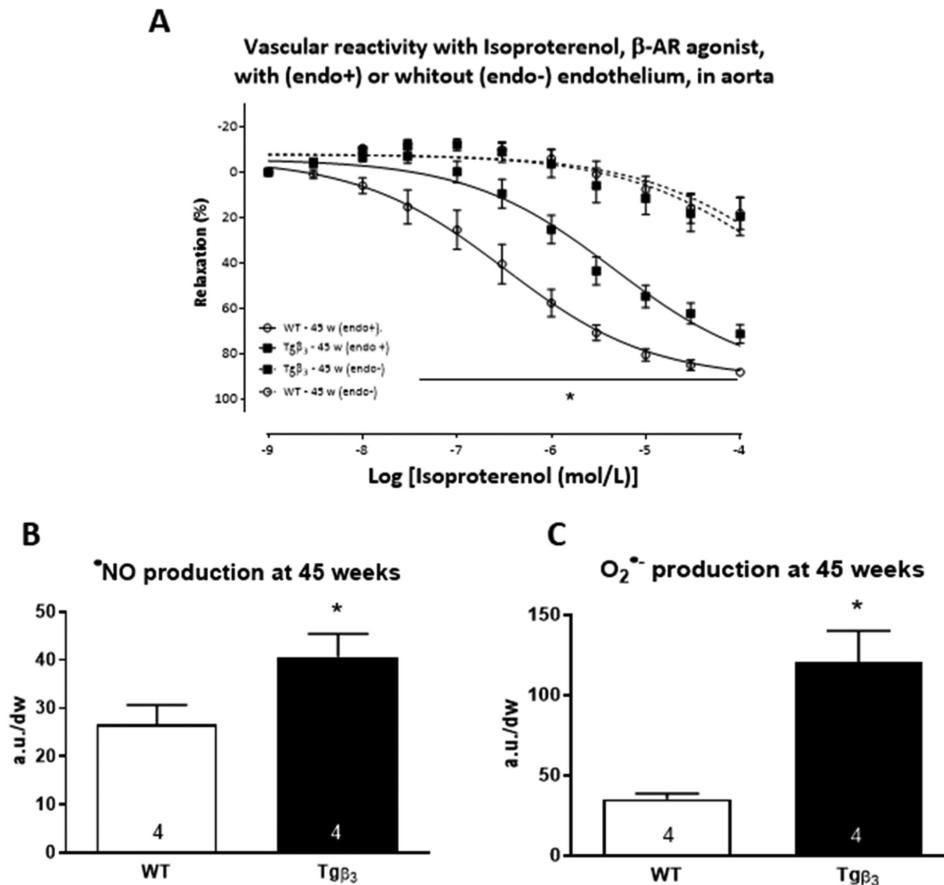
With regard to other physiological parameters, WT and $Tg\beta_3$ male rats at 45 weeks of age presented similar weight

and tibia length (Supporting Information, *Tables S5* and *S6*). Blood pressure assessment revealed that $Tg\beta_3$ male rats did not show any significant modification in systolic (136.3 ± 4.0 mmHg for WT vs. 133.4 ± 4.6 mmHg for $Tg\beta_3$), diastolic (95.3 ± 2.0 mmHg for WT vs. 92.7 ± 3.1 mmHg for $Tg\beta_3$), or mean arterial pressure (109.0 ± 2.6 mmHg for WT vs. 106.3 ± 3.5 mmHg for $Tg\beta_3$) (Supporting Information, *Table S7*).

In vivo investigation of cardiac function

Systolic function, evaluated by the calculated EF, remained normal in both WT and $Tg\beta_3$ rats regardless of age (*Figure 5A*). Repeated measurements over time of early-to-late filing ratios (E/A) revealed that diastolic dysfunction is exacerbated

Figure 4 Vascular reactivity analysis. Concentration–response curves to isoproterenol were obtained by measuring contractility of wild-type (WT) ($\circ$, $n = 4$ –5) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 4$ –5) aorta (A), in the presence (plain line) or absence (dotted line) of endothelium. $^*NO$ (B) and O_2^{*-} (C) production were evaluated by electron paramagnetic resonance spectroscopy in aorta at 45 weeks of age in WT ($n = 4$) and $Tg\beta_3$ ($n = 4$). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. $^*P < 0.05$.



with a restrictive filling pattern over age. Indeed, at 30 and 45 weeks of age, the E/A ratio was significantly increased in $Tg\beta_3$ rats (1.08 ± 0.04 for WT vs. 1.26 ± 0.05 for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$ for 30 weeks; and 1.15 ± 0.01 for WT vs. 1.33 ± 0.04 for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$ for 45 weeks) (Figure 5B). This increase in the E/A ratio was associated with the dilation of the left atrium (LA) (Figure 5C). Also, at 45 weeks of age, $Tg\beta_3$ rats showed a significant increase in left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) (5.57 ± 1.23 mmHg for WT vs. 11.68 ± 1.11 mmHg for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$, Figure 5D). The E/A ratio is low: it is because the heart rhythm is high as a consequence of low anaesthesia, which favours fusion of E wave and A wave and artificially lowers the E/A ratio.

Ex vivo investigation of cardiac function

Intrinsic heart function was evaluated using an isolated working heart model. Under physiological conditions, $Tg\beta_3$ hearts showed a significantly higher LVEDP (+50%), an increase in heart rate (+8%), and a decrease in systolic pressure (–9%) compared with WT animals. *In vivo* blood pressure values did not differ between the groups. The difference between

in vivo and *ex vivo* results is explain by the devoid of any neurohormonal modulation in isolated heart, and one cannot exclude that some circulating factors may, *in vivo*, modulate the cardiac function. Diastolic function of $Tg\beta_3$ hearts was altered, as illustrated by the decrease in dp/dt_{min} (+10%), in relaxation time (+14%), and in diastolic filling period (–28%). The systolic function, systolic ejection period, and contraction time were not statistically different, while dp/dt_{max} was decreased (–10%) in $Tg\beta_3$ hearts. Altogether, these modifications were not associated with cardiac output and coronary flow modification in $Tg\beta_3$ hearts (Supporting Information, Table S8).

Ex vivo investigation of cardiac function under stress conditions

Response to β -adrenergic receptor stimulation

To study the β -adrenergic receptor stimulation occurring during stress-induced catecholamine release on cardiac function, the effect of increasing concentrations of isoproterenol was investigated on isolated WT and $Tg\beta_3$ working hearts. The

Figure 5 Cardiac function. Evolution of systolic function (A) and diastolic function (B) between 15 and 45 weeks measured by echocardiography. Evaluation of the area of the left atrium at 45 weeks by echocardiography (C). Left ventricular pressure measurements at 45 weeks of wild-type (WT) ($n = 7$) and $Tg\beta_3$ ($n = 8$) rats (D). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$.

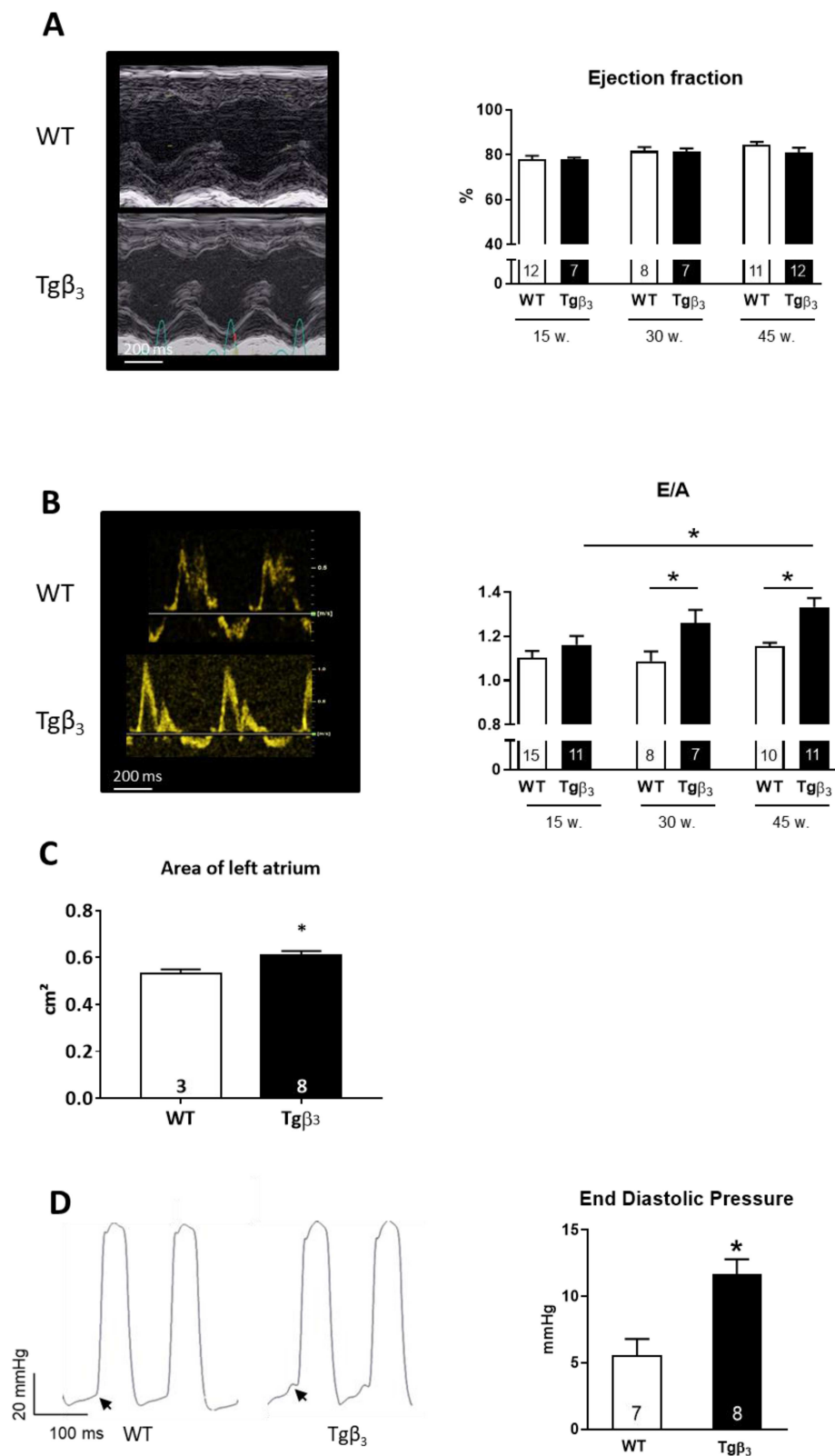
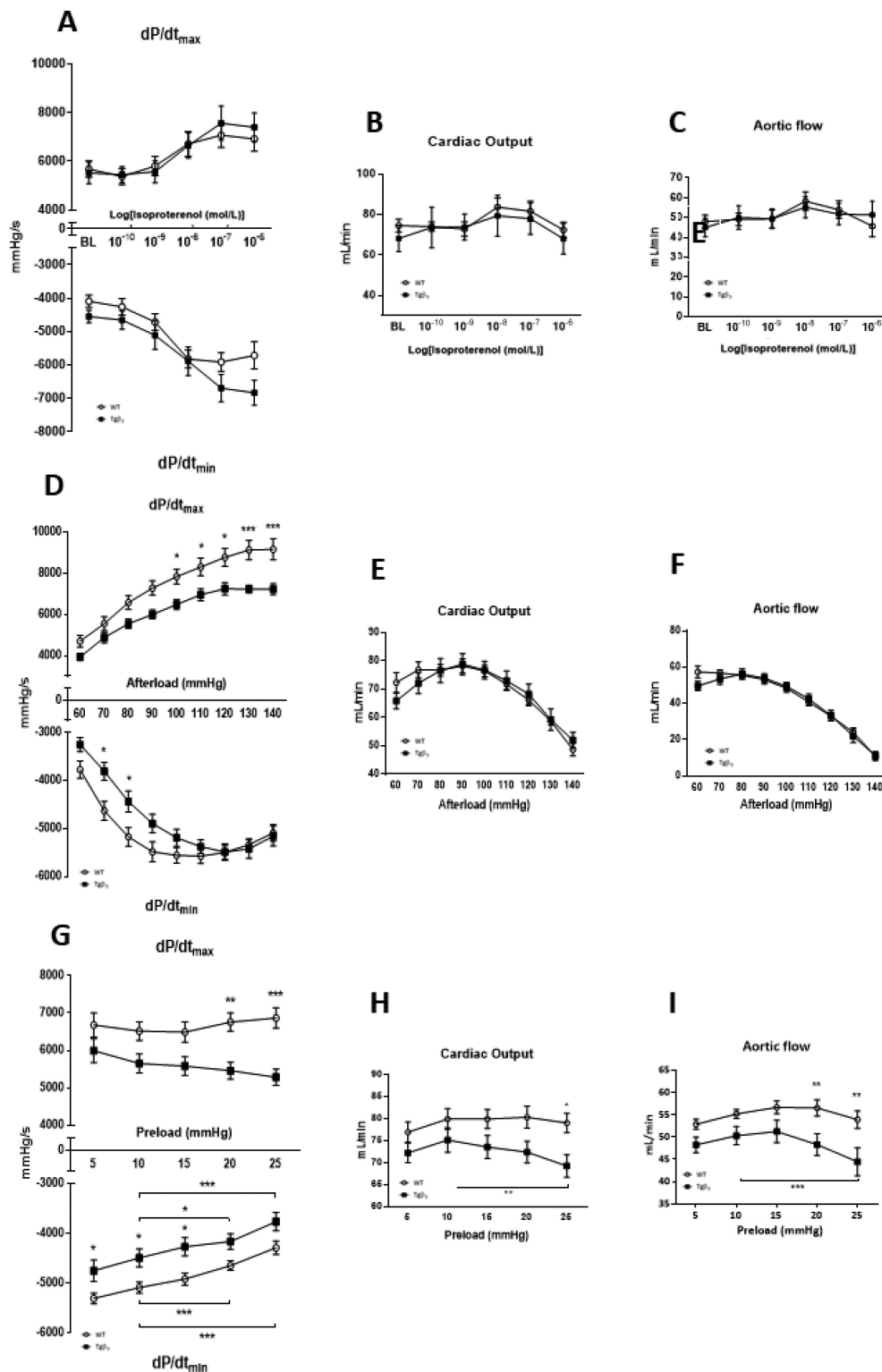


Figure 6 Isoproterenol concentration–response curve in isolated working heart. $dP/dt_{\max}$, $dP/dt_{\min}$ (A), cardiac output (B), and aortic flow (C) were measured on wild-type (WT) ($\circ$, $n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 8$). The effects of an afterload increase on cardiac function of WT ($\circ$, $n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 8$) rats were evaluated on $dP/dt_{\max}$ and $dP/dt_{\min}$ rate (D), cardiac output (E), and aortic flow (F). The effects of a preload increase on cardiac function of WT ($\circ$, $n = 12$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 13$) rats were evaluated through the study of $dP/dt_{\max}$ and $dP/dt_{\min}$ rate (G), cardiac output (H), and aortic flow (I). BL, baseline. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ for WT vs. $Tg\beta_3$.



effects of isoproterenol were similar in both Tg β_3 and WT hearts in terms of cardiac contraction and relaxation rate (Figure 6A), cardiac output (Figure 6B), and aortic flow (Figure 6C). These results are in agreement with the similar transcription levels of β_1 -AR and β_2 -AR expressed in both Tg β_3 and WT rats (Figure 1B).

Response to pressure variation

An afterload increase was applied to reproduce *ex vivo* increases in peripheral resistance and to stimulate the systolic adaptation. From 100 mmHg, adaptation in contractility of Tg β_3 hearts was impaired (for $dP/dt_{\max}$ at 14 mmHg: 9167 ± 510 mmHg/s for WT vs. 7234 ± 263 mmHg/s for Tg β_3 ; $P < 0.05$) (Figure 6D). Cardiac outputs and aortic flows were similar in WT and Tg β_3 hearts (Figure 6E and 6F). In another study, a diastolic stress was applied by gradually increasing the preload in order to mimic pulmonary arterial pressure increase or on venous return. The preload increase induced a significant $dP/dt_{\min}$ elevation in both WT and Tg β_3 . However, WT hearts showed significantly elevated contractility, while the adaptive response of Tg β_3 hearts was impaired (Figure 6G). In the presence of a high preload (25 mmHg), the ejection capacity of Tg β_3 hearts was significantly decreased. We observed a 14% decrease in cardiac output (79.0 ± 2.2 mL/min for WT vs. 69.2 ± 2.6 mL/min for Tg β_3 ; $P < 0.05$) (Figure 6H) and a decrease in aortic flow (Figure 6I). These results reveal that diastole duration and the heart capacity to work were blunted at the highest levels of preload in Tg β_3 hearts.

Discussion

Endothelial overexpression of h β_3 -AR in our model is associated with an endothelial dysfunction along with a slow development of diastolic function alteration, an impaired filling pattern, and an increase in LVEDP. *In vivo* blood pressure and body weight do not differ between the two groups, suggesting that the diastolic dysfunction is observed without the presence of co-morbidities (hypertension, obesity, etc.) contrary to many models that induce HFpEF. The subtle cardiac impairment was exacerbated during stress conditions, especially when the diastolic function was challenged. Our data suggest that this animal model, with endothelial-localized alterations in signalling, develops diastolic dysfunction and endothelial alteration. Tg β_3 rats display a progressive diastolic dysfunction, illustrated by the elevation of their E/A ratio with ageing, associated with an increased LVEDP. The slight but significant increase in collagen deposition (Supporting Information, Figure S3) observed in our model suggests that other parameters are implicated in left ventricular (LV) stiffness and diastolic dysfunction.¹² The absence of cardiac remodeling in male rats Tg β_3 may be surprising. Indeed, the study of Shah *et al.*¹³ have shown a high prevalence of hypertrophy of the left ventricle in HFpEF patient with diastolic dysfunction.

They also rely on the fact that hypertrophy of the LA is correlated with diastolic dysfunction. Ventricular hypertrophy is not associated with diastolic dysfunction in our model. But according to Figure 5C, hypertrophy of the LA is, however, well present in animals with diastolic dysfunction. In addition, other studies in animal models have shown that in the severe stages of diastolic dysfunction, an enlargement of the LA, potentially attributed to a LA–LV decoupling, has been observed.^{14,15} Our study suggests that, in the early development of diastolic dysfunction, the onset of left atrial enlargement may be anterior to ventricular hypertrophy. Indeed, at 60 weeks, a sign of LV hypertrophy was observed with an increase of LV anterior wall depth (Supporting Information, Figure S4A).

It has been described that patients with diastolic dysfunction become pathological when the heart is submitted to a chronic or acute stress. In order to evaluate whether diastolic dysfunction is worsened under stress conditions, we used the working heart technique. This technique allowed us to study the impact of stress specifically on the systolic function, with an increase in afterload, or on the diastolic function, with an increase in preload and a pharmacological stress with isoproterenol. Tg β_3 rat hearts displayed an alteration in contractility only when submitted to a high afterload level (130–140 mmHg). Alteration in contractility was not observed in echocardiographic study due to lower *in vivo* blood pressure (90–100 mmHg). These results suggest that if Tg β_3 rat had hypertension, then they probably would develop a systolic dysfunction. After an increase in preload, Tg β_3 hearts exhibit contractility and relaxation impairment, associated with a significant alteration of cardiac output. During exercise tolerance tests, HFpEF patients develop a strong LVEDP increase, and a decrease in stroke volume, indicating that diastolic function is severely worsened under stress conditions.¹⁶ These results are in accordance with John *et al.* showing that diastolic function in patients is sensitive to preload variations¹⁷ and indicate that heart function in these rats is altered specifically when diastolic function is evaluated.

The present study raises questions concerning the involvement of β_3 -AR in diastolic dysfunction development. In the literature, β_3 -AR has been reported to couple with NOS and to involve the $\text{G}\alpha\text{i}-^*\text{NO}-\text{cGMP}$ pathway,^{10,18,19} which are known to be cardioprotective,²⁰ at least at a physiological expression level of β_3 -AR. Earlier studies have indeed reported a beneficial effect of β_3 -AR stimulation when expressed in cardiomyocytes (not endothelial cells): in acute disorders or anti-hypertrophic effect at an early stage of HF.²¹ In acute disorders, it appears to produce a decrease in myocardial damage by decreasing mitochondrial permeability transition pore opening²² or an anti-hypertrophic effect at an early stage of HF.²¹ We report a deleterious effect of the long-term endothelial overexpression of β_3 -AR suggesting a potential cell-specific effect of this pathway. Conversely, however, an elevated expression of β_3 -AR, maybe associated to an increase in adrenergic stimulation, seems to be

detrimental. At the end-stage of HF, β_3 -AR overexpression is associated with cardiac dysfunction,^{23,24} suggesting that the cardiac effects of β_3 -AR are much more complex than initially thought. In atrial fibrillation, recent studies show that chronic stimulation of β_3 -AR may lead to iNOS uncoupling, leading to oxidative stress and atrial remodelling and atrial fibrillation.^{25–27} In this report, the specific endothelial overexpression of the transgene allows us to suggest that the endothelium acts as a critical actor in the development of diastolic dysfunction. We have shown that the long-term overexpression of β_3 -AR causes alterations in the $\bullet$ NO pathway and in calcium handling of endothelial cells. We have identified changes in NOS expression, in particular an increase in nNOS and iNOS levels occurring concomitantly with a decrease in eNOS expression level. The nNOS overexpression associated with β_3 -AR stimulation in stress condition has been already described.²⁸ The decrease in eNOS expression can tentatively be explained by the increase of inflammation and $O_2^{\bullet-}$ expression that leads to eNOS uncoupling.²⁹ We also investigated the expression levels of cyto/chemokines in plasma and did not observe fluctuations of the concentrations of IL-6 and IL-1 β . We observed a difference, but not significant, in the mean value of TNF- α , suggesting a potential low grade of inflammation at 45 weeks in Tg β_3 rats (Supporting Information, Figure S5). The hypothetical low grade of inflammation could explain the increase of iNOS expression observed at 45 weeks and the eNOS uncoupling leading to endothelial dysfunction over the time.³⁰ But considering our results on inflammation, we cannot confirm the increase of inflammation and further study needs to be performed. This change in expression balance between the different NOS subtypes is associated with a significant increase in $\bullet$ NO production in endothelial cells. This overproduction was not due to the increase in the aortic internal diameters (Supporting Information, Figure S6). β_3 -AR is believed to couple to eNOS and nNOS in endothelial cells, and an alteration in the relative expression levels of nNOS and eNOS in the β_3 -AR overstimulation condition can explain the overproduction of $\bullet$ NO.³¹ We postulate that, in the long run, the change in type of NOS coupling to β_3 -AR and/or the overproduction of $\bullet$ NO, as a result of this change or of the overexpression of β_3 -AR, is associated with a depletion in cellular energy store via different mechanisms such as the activation of poly-ADP ribose polymerase.³² iNOS increase overexpression via β_3 -AR could explain the endothelial dysfunction. Such a process may lead to a progressive alteration of the cardiac function. In addition, the overproduction of $\bullet$ NO has been associated with an increase in nitrosylation and reactive oxygen species production as supported by the increase in $O_2^{\bullet-}$ production in our model. Our results substantiate the involvement of the endothelium in the development of diastolic dysfunction as suggested earlier by Paulus and Tschöpe.⁷ Recently, several studies confirmed the implication of endothelial cells, in both preclinical and clinical studies.⁶ Indeed, Ebner *et al.*

demonstrated a diastolic dysfunction in a model of vascular eNOS dysfunction, suggesting that our animal model could be relevant to understand the pathophysiology underlying HFpEF.³³ Hence, we show that our rat model has important characteristics in common with HFpEF such as preserved EF, diastolic dysfunction, effort intolerance (*ex vivo* studies), age impact, and some structural anomalies as fibrosis, even though it lacks LV hypertension, and we did not observe alterations in renal or pulmonary vascular beds (Supporting Information, Figure S7). The transcriptomic study also confirmed interesting parallels between our model and HFpEF. We confirmed an alteration in the expression of the genes involved in collagen deposition, inflammation, metabolism, and calcium pathways (Supporting Information, Figure S8): a set of pathways also involved in the pathophysiology of diastolic dysfunction. The alteration in the $\bullet$ NO pathway, described in our model, might be linked potentially to other physiopathological mechanisms such as reactive oxygen production. The absence of cardiac dysfunction in female rats, including after ovariectomy, raises interesting questions regarding the implication of gender in our model. This issue was investigated in a recent study and concluded that in the HFpEF model with high-fat diet + N^G -nitro-L-arginine methyl ester, the female sex is protective.³⁴ Now the issue will be to understand the mechanisms involved in this protection of the female sex in preclinical models. In HFpEF, treatment response seems to be different between women and men confirming the importance to study female and male animal in preclinical models.^{35–37} The fact that only male rats develop the pathology is not fully understood in our study. Compared with other studies, we suppose that the addition of co-morbidities in female rats could increase the phenotype of diastolic dysfunction.

Even if Tg β_3 rats have some similarities with HFpEF in humans: diastolic dysfunction, preserved EF, *in vivo* exercise intolerance (Supporting Information, Figure S4B), and a sign of cardiac hypertrophy (Supporting Information, Figure S4A), Tg β_3 rats cannot be considered as a perfect HFpEF model because of the absence of pulmonary oedema (Supporting Information, Figure S4C) or more severe cardiac remodelling. However, the model remains valuable to understand the physiopathology of diastolic dysfunction and may become a greater model of HFpEF provided that other co-morbidities as hypertension or obesity are added to the phenotype.

In conclusion, the Tg β_3 rat is an animal model of diastolic dysfunction. The pathology develops with ageing with a progressive filling impairment at rest, associated with diffuse fibrosis. Moreover, our data demonstrated a similar cardiac response of Tg β_3 rats and HFpEF model when submitted to a stretch-induced stress, illustrating an altered adaptation to stress conditions. This new model confirms that an alteration of the physiology of endothelial cell signalling can lead to diastolic dysfunction. Our new rat model of diastolic dysfunction may help unravel part of the mechanisms involved

in diastolic dysfunction genesis. More importantly, it will help the pharmaceutical industry test some of their most promising leads for the prevention of the pathology.

Acknowledgements

We thank the Therassay platform for their technical assistance, Adrian Chess for careful English revision, and Corinne Mandin for secretarial assistance.

Conflict of interest

None declared.

Funding

This study was supported by 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR-13-BSV1-0003, ANR-11-LABX-0015, Paris, France), 'Fédération Française de Cardiologie' (Paris, France), 'Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée' (Paris, France), 'Fondation de France' (Paris, France), 'Fondation Génavie' (Nantes, France), the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (Paris, France), and Fondation Progreffe (Nantes, France).

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. β_3 -AR antibody (A). Western-Blot of β_3 -AR protein at 15 and 45 weeks (B). β_3 -AR protein level at 15 (Tg β_3 ; n = 4) and 45 weeks (Tg β_3 ; n = 5) (C). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S2. LV pressure measurements of 45 weeks WT (n = 8) and Tg β_3 (n = 9) rats (A). Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echocardiography (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S3. Fibrosis quantification. (A) Cryosections were stained with picosirius red and viewed under polarized light to distinguish type I (red) from type III (green) collagen. Representative views from WT and Tg β_3 samples are presented. (B) Changes in Col3a1 transcript in WT (n = 7) and Tg β_3

(n = 12) rats. (C) Changes in Col1a1 transcript in WT (n = 7) and Tg β_3 (n = 13) rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S4. (A) Left ventricular anterior wall depth in diastole at 60 weeks. (B) Treadmill tolerance test with the evaluation of travelled distance. (C) Lung weight (wet/dry). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S5: (A) Rat IL-1 β plasma concentration (B) Rat TNF- α plasma concentration (C) Rat IL-6 plasma concentration. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S6. (A) Vascular density in myocardium (B) Mean area aorta. Representative views from WT and Tg β_3 samples are presented. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S7. Vascular injuries of lungs and kidneys from WT (n = 8) and Tg β_3 (n = 9) rats. (A) Renal injuries were evaluated using the glomerular score (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S8. Protein expression of PLB (A), of serine 16 phosphorylated PLB (B), of SERCA2 (C), of RyR2 (D) and of serine 2,808 phosphorylated RyR2 (E) all evaluated on whole heart tissue extracts at 45 weeks in WT (n = 4–8) and Tg β_3 (n = 10). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Table S1. Primers used for RT-qPCR experiments.

Table S2. Antibodies used for Western-Blot analyses.

Table S3. Cardiovascular parameters of WT and Tg β_3 females at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S4. Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 female rats at 45 weeks. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S5. Physiological and cardiovascular parameters recorded for WT and Tg β_3 males at 45 weeks of age. E/A: early-to-late filing ratio. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *: $P < 0.05$.

Table S6. Cardiovascular parameters from WT and Tg β_3 males at 15 and 30 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S7. Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age measured by arterial catheterism. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S8. Characteristics of perfused isolated working hearts under physiological condition in WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Afterload was set at 80 mmHg and preload at 12.5 mmHg *: $P < 0.05$.

45wk males differential

References

1. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* 2017; **14**: 591–602.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed* 2016; **69**: 1167.

3. Obokata M, Reddy YNV, Borlaug BA. Diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction: understanding mechanisms by using noninvasive methods. *JACC Cardiovasc Imaging* 2020; **13**: 245–257.
4. Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. *Circulation* 2008; **117**: 2051–2060.
5. Jeong E-M, Dudley SC. Diastolic dysfunction. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 2015; **79**: 470–477.
6. ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, van Heerebeek L, Hillege HL, Lam CSP, Navis G, Voors AA. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail* 2016; **18**: 588–598.
7. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: 263–271.
8. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 2019; **568**: 351–356.
9. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, le Marec H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1377–1384.
10. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996; **98**: 556–562.
11. Chen Y, Park S, Li Y, Missov E, Hou M, Han X, Hall JL, Miller LW, Bache RJ. Alterations of gene expression in failing myocardium following left ventricular assist device support. *Physiol Genomics* 2003; **14**: 251–260.
12. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Van Buren P, Meyer M, Redfield M. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 2015; **131**: 1247–1259.
13. Shah AM, Shah SJ, Anand IS, Sweitzer NK, O'Meara E, Heitner JF, Sopko G, Li G, Assmann SF, McKinlay S, Pitt B, Pfeffer MA, Solomon SD, TOPCAT Investigators. Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. *Circ Heart Fail* 2014; **7**: 104–115.
14. Wallner M, Eaton DM, Berretta RM, Borghetti G, Wu J, Baker ST, Feldsott EA, Sharp TE, Mohsin S, Oyama MA, von Lewinski D. A feline HFpEF model with pulmonary hypertension and compromised pulmonary function. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–13.
15. Zakeri R, Moulay G, Chai Q, Ogut O, Hussain S, Takahama H, Lu T, Wang XL, Linke WA, Lee HC, Redfield MM. Left atrial remodeling and atrioventricular coupling in a canine model of early heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2016; **9**: e003238.
16. Borlaug BA, Vojtech M, Russell Stuart D, Kristy K, Karel P, Becker Lewis C, Kass DA. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 2006; **114**: 2138–2147.
17. John JM, Haykowsky M, Brubaker P, Stewart K, Kitzman DW. Decreased left ventricular distensibility in response to postural change in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **299**: H883–H889.
18. Trapanese DM, Liu Y, McCormick RC, Cannavo A, Nanayakkara G, Baskharoun MM, Jarrett H, Woitek FJ, Tillson DM, Dillon AR, Recchia FA. Chronic β_1 -adrenergic blockade enhances myocardial β_3 -adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β_1 -blocker therapy. *Basic Res Cardiol* 2015; **110**: 456.
19. Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B, Amour J. Involvement of β_3 -adrenoceptor in altered β -adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol* 2008; **109**: 1045–1053.
20. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **40**: 16–23.
21. Belge C, Hammond J, Dubois-Deruy E, Manoury B, Hamelet J, Beauloye C, Markl A, Pouleur AC, Bertrand L, Esfahani H, Jnaoui K. Enhanced expression of β_3 -adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation* 2014; **129**: 451–462.
22. García-Prieto J, García-Ruiz JM, Sanz-Rosa D, Pun A, García-Alvarez A, Davidson SM, Fernández-Friera L, Nuno-Ayala M, Fernández-Jiménez R, Bernal JA, Izquierdo-García JL, Jiménez-Borreguero J, Pizarro G, Ruiz-Cabello J, Macaya C, Fuster V, Yellon DM, Ibanez B. β_3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 2014; **109**: 422.
23. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; **103**: 1649–1655.
24. Morimoto A, Hasegawa H, Cheng H-J, Little WC, Cheng C-P. Endogenous β_3 -adrenoceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H2425–H2433.
25. Dong J, Zhao J, Zhang M, Liu G, Wang X, Liu Y, Yang N, Liu Y, Zhao G, Sun J, Tian J, Cheng C, Wei L, Li Y, Li W. β_3 -Adrenoceptor impairs mitochondrial biogenesis and energy metabolism during rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2016; **21**: 114–126.
26. Sheng L, Shen Q, Huang K, Liu G, Zhao J, Xu W, Liu Y, Li W, Li Y. Upregulation of β_3 -adrenergic receptors contributes to atrial structural remodeling in rapid pacing induced atrial fibrillation canines. *Cell Physiol Biochem* 2012; **30**: 372–381.
27. Wang X, Wang R, Liu G, Dong J, Zhao G, Tian J, Sun J, Jia X, Wei L, Wang Y, Li W. The β_3 adrenergic receptor agonist BRL37344 exacerbates atrial structural remodeling through iNOS uncoupling in canine models of atrial fibrillation. *Cell Physiol Biochem* 2016; **38**: 514–530.
28. Zhang Z, Ding L, Jin Z, Gao G, Li H, Zhang L, Zhang L, Lu X, Hu L, Lu B, Yu X. Nebivolol protects against myocardial infarction injury via stimulation of beta 3-adrenergic receptors and nitric oxide signaling. *PLoS ONE* 2014; **9**: e98179.
29. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases—the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des* 2014; **20**: 3579–3594.
30. Schiattarella GG, Rodolico D, Hill JA. Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 2020; **22**: 139.
31. Moens AL, Yang R, Watts VL, Barouch LA. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**: 1088–1095.
32. Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008; **77**: 19–29.
33. Ebner AKN, Brandt AZB, Weinert SPD, Ebner BAA, Wunderlich CWunderlich CE-AA, Strasser RH. Endothelial nitric oxide synthase-induced hypertrophy and Vascular dysfunction contribute to the left ventricular dysfunction in

- caveolin-1^{-/-} mice. *Can J Cardiol* 2017; **33**: 1716–1724.
34. Tong D, Schiattarella GG, Jiang N, May HI, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Female sex is protective in a preclinical model of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2019; **140**: 1769–1771.
 35. Solomon SD, Rizkala AR, Lefkowitz MP, Shi VC, Gong J, Anavekar N, Anker SD, Arango JL, Arenas JL, Atar D, Ben-Gal T, Boytsov SA, Chen CH, Chopra VK, Cleland J, Comin-Colet J, Duengen HD, Echeverría Correa LE, Filippatos G, Flammer AJ, Galinier M, Godoy A, Goncalvesova E, Janssens S, Katova T, Køber L, Lelonek M, Linssen G, Lund LH, O'Meara E, Merkely B, Milicic D, Oh BH, Perrone SV, Ranjith N, Saito Y, Saraiva JF, Shah S, Seferovic PM, Senni M, Sibulo AS Jr, Sim D, Sweitzer NK, Taurio J, Vinereanu D, Vrtovec B, Widimský J Jr, Yilmaz MB, Zhou J, Zweiker R, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, van Veldhuisen D, Zannad F, Zile MR, McMurray J. Baseline characteristics of patients with heart failure and preserved ejection fraction in the PARAGON-HF trial. *Circ Heart Fail* 2018; **11**: e004962.
 36. Solomon SD, Rizkala AR, Gong J, Wang W, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Zile MR, Desai AS, Shi VC, Lefkowitz MP, McMurray JJV. Angiotensin receptor neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction: rationale and design of the PARAGON-HF trial. *JACC Heart Fail* 2017; **5**: 471–482.
 37. Borlaug BA, Anstrom KJ, Lewis GD, Shah SJ, Levine JA, Koepp GA, Givertz MM, Felker GM, LeWinter MM, Mann DL, Margulies KB. Effect of inorganic nitrite vs placebo on exercise capacity among patients with heart failure with preserved ejection fraction: the INDIE-HFpEF randomized clinical trial. *JAMA* 2018; **320**: 1764–1773.



Protein O-GlcNAcylation in Cardiac Pathologies: Past, Present, Future

Marine Ferron^{1,2*}, Manon Denis², Antoine Persello², Raahulan Rathagirishnan³ and Benjamin Lauzier²

¹ Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada, ² l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France,

³ Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Tarik Issad,

Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

Reviewed by:

Miles J. De Blasio,

Baker Heart and Diabetes Institute,
Australia

Adam R. Wende,

University of Alabama at Birmingham,
United States

*Correspondence:

Marine Ferron
ferronmarine@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 16 July 2018

Accepted: 31 December 2018

Published: 15 January 2019

Citation:

Ferron M, Denis M, Persello A,
Rathagirishnan R and Lauzier B (2019)
Protein O-GlcNAcylation in Cardiac
Pathologies: Past, Present, Future.
Front. Endocrinol. 9:819.
doi: 10.3389/fendo.2018.00819

O-GlcNAcylation is a ubiquitous and reversible post-translational protein modification that has recently gained renewed interest due to the rapid development of analytical tools and new molecules designed to specifically increase the level of protein O-GlcNAcylation. The level of O-GlcNAc modification appears to have either deleterious or beneficial effects, depending on the context (exposure time, pathophysiological context). While high O-GlcNAcylation levels are mostly reported in chronic diseases, the increase in O-GlcNAc level in acute stresses such as during ischemia reperfusion or hemorrhagic shock is reported to be beneficial *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*. In this context, an increase in O-GlcNAc levels could be a potential new cardioprotective therapy, but the ambivalent effects of protein O-GlcNAcylation augmentation remains as a key problem to be solved prior to their transfer to the clinic. The emergence of new analytical tools has opened new avenues to decipher the mechanisms underlying the beneficial effects associated with an O-GlcNAc level increase. A better understanding of the exact roles of O-GlcNAc on protein function, targeting or stability will help to develop more targeted approaches. The aim of this review is to discuss the mechanisms and potential beneficial impact of O-GlcNAc modulation, and its potential as a new clinical target in cardiology.

Keywords: O-GlcNAc, cardiovascular, ischemia-reperfusion, pharmacology, therapy

INTRODUCTION

Definition, Pathway, and Regulation

The O-N-acetyl glucosaminylation, commonly known as O-GlcNAcylation, is a reversible post-translational modification (PTM) that involves the addition of the monosaccharide β -D-N-acetylglucosamine to serine and threonine residues of proteins. It was first described by Torres and Hart on the internal surface of plasma membranes of lymphocytes (1). More recently, it has also been identified on cytosolic, nuclear, mitochondrial and membrane proteins (2–4). Over 3,000 proteins have been identified so far to be O-GlcNAcylated (5), and this number will probably increase with the development of new analytical techniques of O-GlcNAcylation detection such as the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition “click” reaction described recently (6). From 1984 to 2004, <200 publications mentioning the MeSH terms “O-GlcNAc” or “O-GlcNAcylation” are referenced in Pubmed, while in 2017 alone almost 200 references can be found. Initially, little attention was paid to this minor sugar moiety, probably because the tools available to study this PTM were limited. In fact, detecting it is particularly difficult as it cannot be studied with classic techniques such as electrophoresis or high pressure liquid chromatography (HPLC) as the

O-GlcNAc moiety has no impact on molecular weight or isoelectric point, and it is very labile (7). More recently, with the development of more specific pharmacological compounds, protein O-GlcNAcylation has regained attention. Whilst it is now evident that protein O-GlcNAcylation is involved in many pathologies (from cancer to neurological disorders and cardiac function), the overall impact of protein O-GlcNAcylation remains unclear as in some situations it is reported to be beneficial (e.g., ischemia/reperfusion) or deleterious (e.g., diabetes). This suggests a potential role of this PTM in adapting to stress response and its importance in pathophysiological situations.

Protein O-GlcNAcylation is regulated by the concerted actions of only three enzymes. When glucose enters a cell it can be metabolized in a number of different metabolic pathways including glycogen synthesis, the pentose phosphate pathway, the glycolysis, or the hexosamine biosynthetic pathway (HBP, **Figure 1**). The first enzyme, glutamine fructose-6P amidotransferase (GFAT) uses glutamine and 2 to 5% of glycolytic fructose-6-P to perform the first step of the HBP. As the rate-limiting enzyme, GFAT controls HBP flow and consequently the O-GlcNAcylation level (8, 9). Mammals express two GFAT isoforms, GFAT1 and GFAT2, which are coded by separate genes. Both isoforms are expressed in heart. GFAT1 is ubiquitous, and mainly expressed in placenta, pancreas, testis and skeletal muscle. GFAT2 shares 75% homology with GFAT1, and this isoform is mostly expressed in heart and the central nervous system. Once the UDP-GlcNAc group is formed, it can be added or removed from proteins by two enzymes: the O-GlcNAc transferase (OGT) and the β -N-acetylglucosaminidase (OGA), respectively (**Figure 1**). As for GFAT, different splice variants of OGT and OGA exist. Alternative splicing of *ogt* results in the generation of three isoforms, a nucleocytoplasmic (116 kDa-ncOGT), a smaller isoform (70 kDa) named short form (sOGT) and a mitochondrial (103 kDa-mOGT) isoform of OGT. It is unclear if this last isoform is active. The first two isoforms are expressed mainly in the cytoplasm and nucleus as heterotrimers consisting of 2 ncOGT and 1 sOGT subunits (8). Two isoforms of OGA have been formerly described, a long one (LOGA) of 102 kDa found in the nucleocytoplasm, and a shorter one (sOGA) of 76 kDa resulting from alternative splicing. The smaller isoform is found in the sarcoplasmic reticulum and lipid droplets and is less active (4). The existence of a functional mitochondrial OGA isoform is debatable and represents an important area of ongoing research.

Pharmacological Regulation

The development of pharmacological tools to modulate protein O-GlcNAcylation has been very challenging. As discussed below, potent OGA inhibitors are now available for clinical use, but OGT inhibitors still need further development to be used properly *in vivo*. Altogether, these new molecules have allowed extensive characterization of this PTM.

Decrease in O-GlcNAc Levels

GFAT inhibitors

In the 1950's, when O-GlcNAc moiety was not yet discovered, O-diazoacetyl-L-serine (azaserine) and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) were developed to reduce tumor growth (10, 11). These molecules are structural analogs of glutamine and act as competing agonists or antagonists, respectively. They react with the catalytic region of most amidO-transferases, among them GFAT. They have a very low selectivity for GFAT. Whilst these compounds were used to efficiently induce antineoplastic effects, they presented a number of side effects including nausea and vomiting or loss of enthusiasm (12), and DON also causes hepatotoxicity in children (13). Moreover, through amidO-transferase inhibition, these compounds had pleiotropic effects in cells (**Table 1**). Developing new GFAT inhibitors represents a challenge because UDP-GlcNAc is also used for other cellular process, and its inhibition could have many side effects. As a result more attention has been paid to the development of OGT and OGA inhibitors.

OGT inhibitors

Different types of OGT inhibitors exist (**Figure 1**, **Table 1**). In this review, we will only focus on the four most described and used molecules. (1) Alloxan is a uracil analog developed at the beginning of the Twentieth Century (34). It was shown to be an OGT inhibitor on isolated pancreatic islets *in vitro* (35), and is absorbed via the glucose transporter GLUT2 in pancreatic β -cells. However, alloxan is highly unstable at physiological pH (half-life 1.5 min), it drives cell toxicity due to ROS production, and is not OGT specific as it also inhibits OGA (14–16). (2) At the end of the 1960's, benzoxazolinones (4-methoxyphenyl 6-acetyl-2-oxO-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-3-carboxylate, or BZX) and their derived-compounds were proposed as potential new therapeutics due to their anti-cancer and anti-viral properties (17–19). However, as BZX irreversibly inactivates OGT, it cannot be used clinically due to its potential harmful effects on other cellular process (20). (3) BADGP (benzyl-2-acetylmido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside), a N-acetylgalactosamine derivative, was also used as an OGT inhibitor (36, 37). Permanent exposure to BADGP induced abnormal O-glycosylation of mucins in HT-29 cells with potential negative effects on host defenses against pathogens (21–23). (4) Finally, a last inhibitor: Ac-5SGlcNAc, was proposed in 2011. This compound produced 5S-UDP-GlcNAc that binds to OGT and inhibits its activity. Authors demonstrated dose and time-dependent effects of this inhibitor (from 0.1 to 1,000 μ M) and an EC₅₀ at 5 μ M in COS7 cells. These results were confirmed in fibroblasts, hepatocytes and neuronal cells, and by others in different cell types especially in an oncologic context. Contrary to the three first OGT inhibitors, Ac-5SGlcNAc does not perturb lectin glycosylation even at the highest dose. Thus, this compound is more frequently used in basic research, however, there is, today, no evaluation of its *in vivo* efficiency and safety (24).

In summary, whilst OGT inhibitors currently lack specificity and selectivity, improvements in OGT inhibitors is necessary

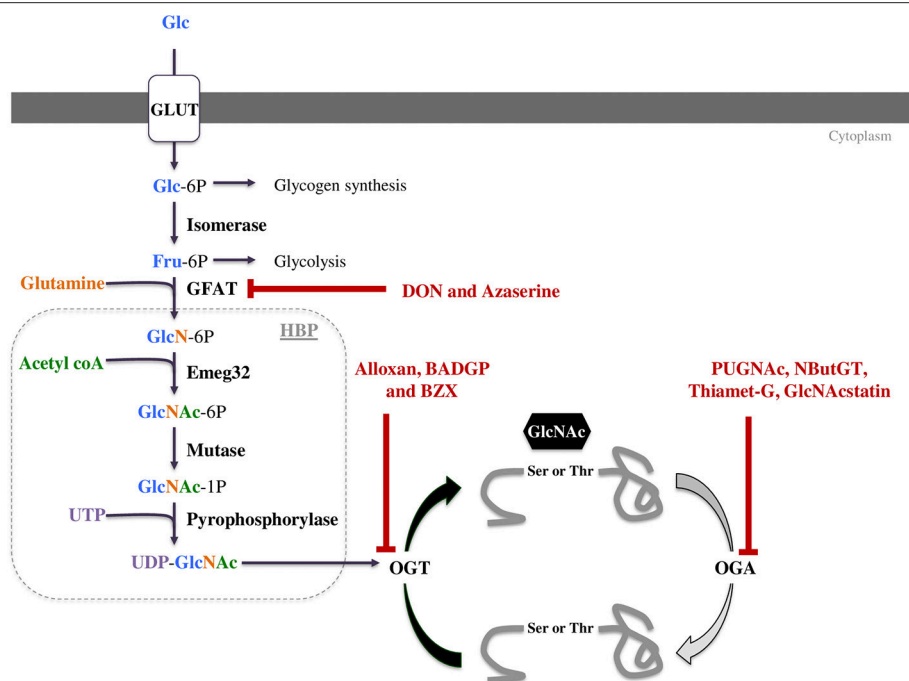


FIGURE 1 | The hexosamine biosynthetic pathway (HBP) leads to UDP-GlcNAc formation and regulates O-GlcNAcylation. This pathway is regulated by only three enzymes: GFAT (glutamine fructose-6P aminotransferase), OGT (O-GlcNAc transferase) and OGA (O-GlcNAcase). These three enzymes can be targeted by pharmacological compounds to modulate O-GlcNAc levels. Some of them decrease O-GlcNAc levels such as DON and azaserine inhibiting GFAT or Alloxan, BZX and BADGP inhibiting OGT. OGA inhibitors like PUGNAc, NButGT, Thiamet-G and GlcNAcstatin increase protein O-GlcNAcylation.

to be able to reduce protein O-GlcNAc levels and represents a potentially huge opportunity to reduce cancer or diabetes burden.

Increase in O-GlcNAc Levels

The development of strategies to increase O-GlcNAc levels has been more successful and can be used in human. Two different approaches are available to increase protein O-GlcNAc levels: increase in total UDP-GlcNAc through an increase in HBP flux or pharmacological inhibition of OGA.

Increase in UDP-GlcNAc concentration

Glucosamine (GlcN) bypass the rate limiting enzyme of the HBP, GFAT (38) resulting in higher UDP-GlcNAc levels, consequently it increases protein O-GlcNAcylation. Yet, if GlcN increases protein O-GlcNAc levels by 2 or 3-fold, this compound also has side effects such as: decrease in ATP production or increase in proteoglycans production (39, 40).

OGA inhibitors

Another way to increase protein O-GlcNAcylation is to inhibit OGA, and different molecules have been developed over the last 20 years. (1) The first described in the literature is the O-(2-acetamidO-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-aminO-N-phenylcarbamate commonly known as PUGNAc. It has been the most widely used compound to inhibit OGA for about a decade. However, PUGNAc also reacts with other hexosaminidases (HEX) such as lysosomal β -hexosaminidases with an inhibition ratio OGA/HEX of 1 (29). Recent OGA crystallography studies lead to the development of specific

OGA inhibitors (31). These molecules interact directly with the active site of OGA, and include NButGT, Thiamet-G, and GlcNAcstatins. (2) NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl- α -D-glucopyranosO-(2,1-d)- Δ 2'-thiazoline) is a competitive inhibitor of OGA and has good efficiency and specificity (Table 1). However, according to a study by Macauley et al. NButGT has a half-clearance of only 30 min *in vivo*, and lacks stability in solution (few days to weeks) (30). (3) Thiamet-G [(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-ethylaminO-3a,6,7,7a-tetrahydrO-5-(hydroxymethyl)-5H-pyrano(3,2-d)thiazole-6,7-diol] was developed several years later, and is more stable (31). (4) More recently, GlcNAcstatin has been described. It presents a molecular architecture noticeably similar to PUGNAc (Table 1) (32, 33), with a high selectivity and efficiency. Unfortunately, synthesis of GlcNAcstatin remains complex and very expensive (41).

Over the last decade, pharmacological modulators of O-GlcNAc levels have been developed for (i) improved knowledge of physiological conditions, as well as (ii) potential utilization as therapeutic strategies in different pathologies.

POTENTIAL IMPACT OF MODULATING O-GLCNAc LEVELS IN PATHOLOGIES

The consequence of an increase in protein O-GlcNAcylation has mainly been evaluated in diabetes or cancers. In these pathologies, patients with high O-GlcNAc levels present with the poorest outcome. In this context, a reduction in O-GlcNAc levels

TABLE 1 | Summary of molecules currently available for O-GlcNAc level modulation: their actions, specificity, known limits and strengths.

Effects	Action	Molecule	IC50	Strengths	Weaknesses	References
O-GlcNAc decrease	GFAT inhibition	DON		Uses in oncologic research for its anti-neoplastic properties	Low selectivity for GFAT, toxic effects, pleiotropic effect	(10–14)
		Azaserine				
	OGT inhibition	Alloxan	18 μ M	Cell permeant through glucose transporter (GLUT2 in pancreatic beta cells)	Off target effects, toxicity, induced ROS production, instable at physiologic pH (half-life 1,5 min)	(14–16)
		BZX	10 μ M	Cell permeant, anti-cancer and anti-viral properties	Harmful effects on cellular process	(17–20)
		BADGP			Abnormal O-glycosylation	(21–23)
		Ac-5SGlcNAc	5 μ M	No modification of lectin glycosylation, uses in oncologic research	No use in <i>in vivo</i> conditions	(24, 25)
O-GlcNAc increase	UDP-GlcNAc increase	Glutamine		Used in hospital	Poor efficiency, pleiotropic effects	(9, 26–28)
		Glucosamine				
	OGA inhibition	PUGNAc		First OGA inhibitors synthesized	Poorly specific(OGA/HEX=1), desensitizes cell to insulin, doesn't cross blood brain barrier	(14, 29)
		NButGT	8 μ M	High specificity(OGA/HEX=1,500)	Lack of stability <i>in vivo</i> (half clearance 30 min), limited chemical stability in solution	(30, 31)
		Thiamet G	30 nM	High specificity(OGA/HEX=35,000)	Expensive	(31)
		GlcNAcstatin G	4 nM	High specificity(OGA/HEX=900,000)	Expensive, lack of study	(32, 33)

OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; GFAT, glutamine fructose-6P amidotransferase; DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine; BADGP, benzyl-2-acetymidO-2-deoxy- α -D-galactopyranoside; BZX, benzoxazolinones; IC 50, concentration of inhibitor required for achieving 50% inhibition; GLUT 2, Glucose Transporter Type 2.

appears to be an interesting therapeutic strategy. Alternatively, in acute pathologies, O-GlcNAc stimulation using different approaches to increase O-GlcNAc levels could be a promising therapeutic approach.

Increasing O-GlcNAc Levels in Acute Pathology, a Potent Therapeutic Approach?

Several studies have demonstrated the importance of O-GlcNAc response to a stress, and especially an increase in O-GlcNAc levels following this stress. This augmentation is reported to improve cell survival through a decrease in pro-apoptotic pathway molecules (p53, FOXO3, caspase 8 or GPAT1) and activation of sirtuin deacetylase (SIRT1) (42–45). Similarly, the beneficial effects of protein O-GlcNAcylation stimulation, with GlcN or siOGA, are associated with a decrease in apoptosis (46–48). These *in vitro* results were confirmed *in vivo* for different types of stress (e.g., hypoxia, inflammation, oxidative stress), and in different tissues and/or different pathologies.

In kidney, damage caused by hypoxia or an acute injury using a rabbit model are attenuated by GlcN administration (49). Hu et al. also reported an improvement in renal function and a decrease in apoptosis and oxidative stress markers, and these effects were abolished with alloxan (45). In a brain model, using a middle cerebral artery occlusion (MCAO), it was shown that

an increase in O-GlcNAc levels, by GlcN or Thiamet G, resulted in reduced infarct volume and an improvement in cognitive function. These effects could be explained by a reduction in apoptosis and inflammation (suglia and NF- κ B activation, reduction of cytokine production and leukocyte infiltration) (50–52). In hemorrhagic shock, hypovolemia is associated with an alteration in glucose utilization. Using *in vitro* (neonatal rat ventricular cardiomyocytes) and *in vivo* (rat) models of hemorrhagic shock Chatham's group demonstrated that augmentation of O-GlcNAc levels improved global outcomes. Specifically, GlcN improved organ perfusion, cardiac function, the inflammatory state and finally, increased survival (53, 54). Several years later, these results were confirmed with a specific inhibitor of OGA, PUGNAc, validating the potential therapeutic role of protein O-GlcNAcylation in this pathology (53, 55). In all these studies, cardiovascular function was significantly improved.

Ischemia-Reperfusion From *ex vivo* to *in vivo*

Myocardial infarction results from an obstruction of a coronary artery creating an ischemia leading to tissue necrosis. Reperfusion, by thrombolysis or invasive procedures, is the only way to preserve cardiac function and to save patient life and must be performed as early as possible and within the first 12 h. Unfortunately, reperfusion exacerbates cardiac injury through

an excessive oxidative stress and inflammatory response. In this context, the introduction of an infarct-limiting therapy in clinical practice might have a clinical and socioeconomic impact (56).

The first evidence of the potential beneficial effects of O-GlcNAc was shown *in vitro*. Champattanachai and collaborators reported that an increase in O-GlcNAcylated proteins through GlcN infusion in rat neonatal cardiomyocytes improved cell viability following IR. Moreover, with the use of different pharmacological compounds (glucosamine, PUGNAc, azaserine, alloxan), they demonstrated a positive correlation between O-GlcNAc levels and cell viability in IR. According to the authors, the beneficial effects of GlcN are associated with a decrease in calcium overload and apoptosis through a reduction in mitochondrial permeability, transitional pores, or mPTP opening (57, 58). A second team confirmed these results by specifically targeting OGA. They modulated O-GlcNAc levels by PUGNAc, adenoviral overexpression of OGA or siRNAs against OGA, and demonstrated that an increase in O-GlcNAc levels increased cell viability and decreased apoptosis and oxidative stress in responses to IR (59, 60).

To confirm these initial *in vitro* findings, *ex vivo* studies have also been performed. A first study using a Langendorff model of IR demonstrated that glutamine improved cardiac function through an improvement of left cardiac function (ventricular pressures and heart rate) and a decrease in infarct size (cardiac troponin I release). According to these authors, this could be explained by a restoration in cellular ATP concentration (61). Once again, these beneficial effects were confirmed using an OGA inhibitor, NAG thiazolines, and this compound also reduced infarct size and mechanical arrhythmic activity (62).

Intriguingly, the number of *in vivo* studies is quite limited and only focuses on murine models. Considering the potential clinical impact of O-GlcNAc stimulation on cardiac function, it remains as an important step to continue toward clinical validation. The only direct *in vivo* evidence confirming *in vitro* results is from mice treated with PUGNAc at the reperfusion stage. This treatment efficiently reduced infarct size, apoptosis and mPTP opening (63). However, many *in vivo* studies indirectly suggest that O-GlcNAc stimulation could improve patient outcomes. For example, hearts submitted to preconditioning (two periods of 5 min ischemia and 5 min reperfusion) presented a higher myocardial glucose uptake and a higher protein O-GlcNAcylation, and a better recovery. In this context, the authors explained that the O-GlcNAc level increase was responsible for the cardioprotective preconditioning effect (64).

TOWARD A POTENTIAL CLINICAL APPLICATION

From Bench to Bedside, a Complicated Step

Several studies in cellular and animal models have demonstrated the potential beneficial effects of O-GlcNAc level augmentation in acute pathologies, and especially in cardiac IR. However, several limitations still exist and these need to be studied before a potential clinical application. Whilst acute O-GlcNAc

level augmentation is cardioprotective in murine models, the adverse effects of a long-term exposure to high O-GlcNAc levels should also be considered. For instance, hearts isolated 1 month after myocardial infarction induced by coronary ligation presented high levels of protein O-GlcNAcylation, and especially higher O-GlcNAcylation of troponin T, and this observation was linked to higher cardiac dysfunction (65). Similarly, in rats subjected to hypoxic conditions (alternating 2 min 21% O₂ and 2 min 6–8% O₂ 8 h per day) O-GlcNAc levels started to rise 2 weeks after the first stress. This observation was associated with higher apoptosis and inflammatory markers (66). Myocardial infarction and the resulting reperfusion injury is associated with cardiac remodeling, hypertrophy and heart failure, a situation aggravated by high O-GlcNAc levels, even if there is still no consensus regarding the link between O-GlcNAcylation of proteins and cardiac hypertrophy (67, 68). However, several studies have demonstrated an increase in cardiac protein O-GlcNAcylation in *in vitro* and *in vivo* models of hypertrophy (69–73). O-GlcNAc levels in the left ventricular myocardium were increased in patients with heart failure (73). Furthermore, increases in O-GlcNAc levels were associated with heart failure development (65, 74). In parallel, augmentation of protein O-GlcNAcylation turns out to be an adverse therapy for diabetic patients. In diabetic IR conditions, hyperglycemia and high O-GlcNAc levels are also associated with an aggravation of cardiac dysfunction and infarct size (75, 76).

In summary, before clinical trials can be conducted, more studies are necessary to characterize the potential long-term impact of O-GlcNAc stimulation and to evaluate the best dose, time-point and duration of treatment to avoid adverse effects.

To Future Potential Clinical Trial in Cardiology

Glutamine and glucosamine are metabolites used in the HBP pathway and could be a way to increase O-GlcNAc levels via an increase in HBP flux. These two molecules are already used clinically to treat inflammatory disease or improve cardiac function, and could provide proof of potential utilization in cardiac acute pathologies like IR. Despite this, their impact on O-GlcNAc level has never been tested in humans.

Glutamine supplementation is now recommended for parenteral or enteral supplementation in neonatal, pediatric and adult intensive care units and seems to be safe (26, 27). Moreover, in pediatric or adult intensive care units, patients with low plasma glutamine (<420 μmol/l) at admission are at higher risk of mortality and increased incidence of multiple organ failure (77, 78). Whilst this observation suggests a potential benefit from increasing glutamine concentration the consequence on protein O-GlcNAcylation has never been studied. Enteral glutamine supplementation has been shown to reduce the incidence of serious neonatal infections in preterm and/or very low birth weight children (79) and enterocolitis (80, 81). In critical conditions, glutamine enteral supplementation decreases the incidence of sepsis, pneumonia, and bacteremia in trauma (82) and burn patients (83). Moreover, glutamine may have a

perioperative cardioprotective role. Glutamine use in patients with ischemic heart disease operated under conditions of extracorporeal blood circulation or cardiopulmonary bypass reduces troponin release at day 1, the systemic vascular resistance index and improves cardiac and stroke index (84, 85). As well, perioperative glutamine supplementation during aortic surgery can compensate renal arginine synthesis loss induced by aortic clamping and could also improve post-operative renal function (86). A recent clinical trial showed that patients who receive oral glutamine have less complications, myocardial damage, morbidity and mortality after coronary revascularization under cardiopulmonary bypass (87). A similar protocol in chronic angina patients, delayed the time to onset of more than 1.0 mm of ST segment depression on the electrocardiogram (ECG) by 38 s, but did not improve hemodynamic response to exercise, the time of onset of angina symptoms, maximum workload or total exercise time (88).

GlcN is largely used for osteoarthritis at an average dose of 1,500 mg per day but its usefulness in other pathologies has not been explored in clinical trials. Whereas, long term treatment seems to delay the progression of knee arthritis (28), multiple studies have shown no superiority of glucosamine vs. placebo (89), no improvement of cartilage damage (90) and no role in prevention of osteoarthritis in overweight women (91). Moreover, at the usual doses, GlcN may induce an increase in intraocular pressure (92). This possible deleterious effect of high dose GlcN is supported by a recent review that showed this molecule is not beneficial for all population subgroups (93). Clinical use of GlcN has been associated with potential side effects *in vivo*, among them vomiting and diarrhea (94) and has also been associated with intracellular ATP depletion (95). Overall, GlcN utilization for joint pain appears to be safe.

Glutamine or GlcN supplementation has demonstrated its benefits for a few pathologies but these molecules are not specific to the HBP, and the link between the benefits and an increase in protein O-GlcNAcylation has not been demonstrated. Recently, new molecules targeting OGA have been studying for the treatment of tauopathy. MK-8719, a selective and potent small molecule inhibitor of OGA has shown promising results in the treatment of tauopathy such as Progressive Supranuclear Palsy (PSP). It has been evaluated in a recent phase I study in healthy volunteers. Interestingly, MK-8719 administration elicited PBMC O-GlcNAcylated protein increases in a dose dependent-manner, consistent with preclinical observations. Moreover, ASN120290, a brain-permeable small-molecule OGA inhibitor, has been also studied in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I study. These molecules seem to be safe and well tolerated (96).

These molecules represent a huge opportunity for progression to future clinical trials. Despite the beneficial impact of an increase in total O-GlcNAc level in IR, the treatment remains non-selective and can have potential side effects that have not been clearly evaluated in most studies. In future studies, more attention should be paid to doses and administration time to avoid any drawback.

What Should be Confirmed Prior to Performing Clinical Trials?

Understanding Metabolism and O-GlcNAc Level Variation Through Aging

O-GlcNAc levels are linked to GFAT activity and cellular metabolism, particularly that of glucose. This observation is particularly important in cardiac tissue as cardiac metabolism constantly adapts to conditions and evolves throughout the first stage of life, especially the substrate selection for energy production. The predominant substrates for energy production in fetal hearts are carbohydrates (mainly glucose, lactate and pyruvate) and cardiac metabolism is mainly anaerobic. After birth, the ability of hearts to oxidize fatty acids increases within the first week (97), and in the adult heart, energy is mainly supplied by fatty acid oxidation (60–80%), carbohydrates (20–30%) and ketone bodies (10%). These proportions are constantly modulated to fit requirements and substrate availability. During fetal life, cardiac glucose uptake is controlled by a low affinity insulin-independent glucose membrane transporter, Glucose transporter type I (GLUT1). Shortly after birth, cardiac glucose transporters switch from the GLUT1 isoform to the GLUT4 isoform. GLUT4 is an insulin-sensitive glucose transporter, which is the predominant transporter in the adult heart (97). This observation is of particular importance as changes in glucose transporter expression, such as GLUT1 and GLUT4, have been shown to influence UDP-GlcNAc levels in mice. Interestingly, GFAT activity and glucose flux via the HBP are increased in muscles of GLUT1-overexpressing mice but not GLUT4-overexpressing mice (98). Consequently, during the first days of life, cardiac metabolism is subjected to dramatic changes with a major increase in fatty acid oxidation and a reduction in carbohydrate metabolism, whilst the impact on protein O-GlcNAcylation remains unknown. Altogether, the metabolic modification associated with the first days of life could impact O-GlcNAc levels and be of great importance in cardiac development and maturation. They could also be responsible for the higher capacity of the heart to withstand stress during the first days of life (99–101). Furthermore, in situations of stress or specific pathological conditions, the proportion of carbohydrates metabolized will increase to sustain cardiac needs. In the long run, this modification will affect HBP flux and modulate O-GlcNAc levels resulting in a potential impact on cardiac function. Interestingly, no study has evaluated if these modifications actually have an impact on cardiac O-GlcNAcylation.

While metabolism is subject to modifications throughout aging, and while protein O-GlcNAcylation has been described as a metabolic sensor, the exact link between metabolism's age-associated variations and O-GlcNAc levels has never been explored. In fact, many authors have only focused on senescence, and demonstrated that O-GlcNAc levels have an impact on the development and the progression of chronic diseases (102, 103).

The variation of O-GlcNAc levels during aging has not reached a consensus yet. Fülöp et al. showed a decrease in O-GlcNAc levels in rat hearts which was associated with a reduction in OGT expression between adolescence (6 weeks)

and adulthood (22 weeks) (104). However, in another study, the authors showed an increase in O-GlcNAc levels in rat hearts between 5 and 24 months, which surprisingly, was associated with a decrease in OGT expression (105). In the brain, which is the most studied organ for this question, age-associated variation of protein O-GlcNAcylation is not clear. O-GlcNAc levels rapidly decrease between the 1st and the 24th month (106) or increase between 5 and 24th month (105), whereas Rex-Mathes et al. showed no change in protein O-GlcNAcylation between the 3rd and 13th month (107) (Figure 2).

The lack of consensus on O-GlcNAc level variation throughout aging and in organ function underlines the need for new standardized studies to improve the understanding of O-GlcNAc levels on cellular development, survival and potential impacts on pathology or treatment responses.

Doses and Timing of Treatment

The ambiguous effects of O-GlcNAc is not restricted to the differences in basal O-GlcNAc levels, as it is now evident that there are dose-dependent effects of protein O-GlcNAcylation. The beneficial effects associated with increase in O-GlcNAc are lost for high increase in O-GlcNAc level. Gu et al. showed for brain IR that a high increase in O-GlcNAc levels (~7 fold) compared to a moderate increase in O-GlcNAc level (~3 fold) leads to a detrimental effect with an increase in infarct size. Strikingly, most of the beneficial effects described in the literature are associated with a 2–5 fold increase in protein O-GlcNAcylation levels in the heart (45, 57, 61), and in the brain (51, 108–110). Champattanachai et al. showed similar results, and highlighted a close link between O-GlcNAc levels and cell viability in their model (57). Unfortunately, few studies have focused on O-GlcNAc level modulation in physiological or pathophysiological conditions. In addition,

the same authors showed that GlcN increases the level of protein O-GlcNAcylation by 1.5 fold in normoxia, and by 3 fold in hypoxia (57). The stimulation of this PTM could induce different responses in pathophysiological conditions. Interestingly, a recent clinical study showed that delayed sepsis treatment using 0.35 g/kg of glutamine per day *i.v.* and 30 g per day glutamine given via enteral administration to patients with two or more failing organs, had no effect on the outcome of organ failure and infections. It even increased mortality in hospital and at 6 months (111). These results might be explained by the high dose of glutamine (dose-dependent effect) and/or the late initiation of the protocol (time-dependent effect).

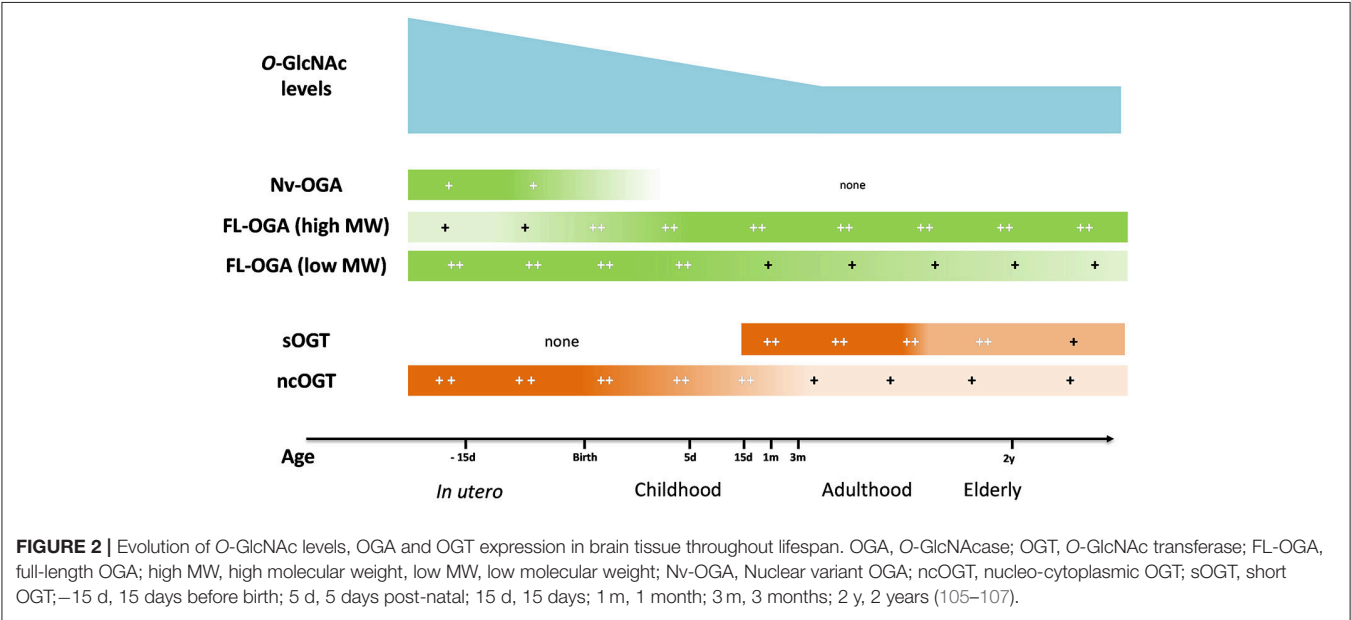
The lack of data on dose and time of treatment remains the key safety issue that needs to be satisfied in order to progress toward a clinical trial. Only one study has focused on establishing an optimal glutamine supplementation dose in pediatric cancer patients, however they did not evaluate the impact on O-GlcNAc levels (112).

IMPROVEMENT OF TOOLS

In order to improve the understanding of the impact of O-GlcNAc on proteins and cell survival considerable progress has been made in developing new tools. Three main themes are of particular importance and have gained momentum over the last couple of years: (i) identifying O-GlcNAcylation sites on protein using mass spectrometry, (ii) improving pharmacological tools to improve specificity and biocompatibility, and (iii) understanding the impact of O-GlcNAcylation on specific proteins.

Emerging Analytical Tools

As discussed above, there is a significant conundrum for protein O-GlcNAcylation, with on one-hand, potential short-term



beneficial effects and on the other hand long-term deleterious effects. It is important to decipher which O-GlcNAc sites are of interest and potentially beneficial or potentially detrimental. Hopefully, in the near future, specifically targeting these sites will potentiate the beneficial effects and limit adverse effects associated with untargeted increases in O-GlcNAc level. Global mapping of O-GlcNAcylated proteins and peptides has recently been possible using mass spectrometry approaches. Recent advances in analytical techniques have also allowed to determine O-GlcNAcylation sites. For example, Thompson et al. highlighted “emerging technologies for quantitative, site-specific MS-based O-GlcNAc proteomics (O-GlcNAcomics), which allow proteome-wide tracking of O-GlcNAcylation dynamics at individual sites.” In this article, the authors listed the current technique for O-GlcNAc identification using mass spectrometry (6). Many papers have described the successful use of a combination of fractionation and click chemistry to label and identify O-GlcNAc sites on proteins. For example, Griffin et al. extensively studied the O-GlcNAcylation site on OGT with a chemically cleavable tag and suggested a potential implication of O-GlcNAc on the regulation of protein function (113). More recently, Deracinois et al. used this approach on skeletal muscle proteins and reported that some O-GlcNAcylation sites were located in interaction sites that open new area of research for this PTM (114). Thanks to the development and thorough validation of these new tools, consensus sequences have recently been proposed (115). Recent advances in technologies represent a huge opportunity and will definitely help to improve the understanding of the role of this PTM.

Toward Specific Pharmacological Tools

Pharmacology has long been used to study different pathways and targets, and OGA, GFAT and OGT inhibitors have been known about since the early 90's. At present however, the main drawback of these compounds are their lack of specificity and affinity and their toxicity.

OGA inhibitors have been most beneficial and are now available for clinical trials. In fact, they have been the prime targets to develop a therapeutic strategy (29). The remaining challenge is in the potential directed system administration, in order to limit the potential off target effects. While the use of enzymatically triggered prodrugs is well known in the field of cancer, this strategy is poorly developed for treatment of other pathologies. In parallel, a second strategy could be to design new OGA inhibitors targeting specific organelles (e.g., mitochondria) or organs. Such tools would present two major advantages as they would help to: (i) decipher the role of this PTM on different organelles and (ii) improve treatment specificity. On the other hand, while OGT inhibitors potentially represent an interesting therapeutic strategy for cancer, they still lack specificity, are not cell permeant or are toxic.

Recent advances in crystallography opens potentially new avenues to study the impact of O-GlcNAc levels on cellular function. The next step will be to specifically target cellular

compartments and/or specific proteins to be able to maximize potential beneficial impacts on selected pathways or cellular processes (61, 115–118).

Site Specific Evaluation

Recent advances in O-GlcNAc proteomics has produced a very large quantity of potential sites to explore. It is now important to develop screening tools to be able to further advance our understanding of protein O-GlcNAcylation. Because only two enzymes are involved in O-GlcNAcylation, a solution may rely on biochemistry, and more specifically on site-specific mutagenesis through the incorporation of non-natural amino acids (NAA) such as selenocysteine derivatives. NAA are useful tools to add new properties to proteins at specific positions. They can be incorporated into a protein sequence during translation through genetic code expansion by an orthogonal (i.e., not interfering with the natural amino acids system) aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS). This TAG codon is positioned in an appropriate position into the recombinant proteins gene (119, 120). Protein function could then be evaluated through enzymatic assays for example.

CONCLUSION

Over the last 30 years, knowledge on protein O-GlcNAcylation has increased considerably in many areas, yet, the cardiovascular field remains largely underexplored. A pubmed search using the “cardiovascular” and “O-GlcNAc” MeSH term retrieved only 187 papers in October 2018. More effort has been expended on chronic pathologies such as diabetes, cancer, and Alzheimers disease, leading to potential new approaches for the patient. On the acute side, augmentation of O-GlcNAc levels may represent a new therapeutic solution for cardiovascular dysfunction or ischemia/reperfusion, yet its potential harmful effects at higher doses, or the impact of long term stimulation remain to be determined. Furthermore, deciphering which protein or pathway is involved in O-GlcNAc effects represents the key element to be able to specifically target them. The future may be hidden in organelle specific O-GlcNAc modulation or in new proteomic approaches with powerful tools to study O-GlcNAcylation. Increasing the understanding of this very specific PTM will open complete new area of research for protein-targeted mutation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF, MD, AP, and RR wrote the review. BL corrected the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Bryce Van Denderen for English revision. We would also thank Fédération Française de Cardiologie, Fondation d'entreprises Génavie for their financial support and the IBISA core facility Therassay for its assistance and their technical support.

REFERENCES

- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* (1984) 259:3308–17.
- Holt GD, Hart GW. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* (1986) 261:8049–57.
- Schindler M, Hogan M, Miller R, DeGaetano D. A nuclear specific glycoprotein representative of a unique pattern of glycosylation. *J Biol Chem.* (1987) 262:1254–60.
- Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2017) 18:452–65. doi: 10.1038/nrm.2017.22
- Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics* (2014) 11:8. doi: 10.1186/1559-0275-11-8
- Thompson JW, Griffin ME, Hsieh-Wilson LC. Methods for the detection, study, and dynamic profiling of O-GlcNAc glycosylation. *Methods Enzymol.* (2018) 598:101–35. doi: 10.1016/bs.mie.2017.06.009
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* (2011) 80:825–58. doi: 10.1146/annurev-biochem-060608-102511
- Love DC, Hanover JA. The hexosamine signaling pathway: deciphering the “O-GlcNAc code.” *Sci. STKE* (2005) 2005:re13. doi: 10.1126/stke.3122005re13
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* (1991) 266:4706–12.
- Coffey GL, Ehrlich J, Fisher MW, Hillegas AB, Kohberger DL, Machamer HE, et al. 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine, a new tumor-inhibitory substance. I. Biologic studies. *Antibiot Chemother.* (1956) 6:487–97.
- Stock CC, Reilly HC, Buckley SM, Clarke DA, Rhoads CP. Azaserine, a new tumour-inhibitory substance; studies with Crocker mouse sarcoma 180. *Nature* (1954) 173:71–2. doi: 10.1038/173071a0
- Milewski S. Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* (2002) 1597:173–92. doi: 10.1016/S0167-4838(02)00318-7
- Cervantes-Madrid D, Romero Y, Dueñas-González A. Reviving lonidamine and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine to be used in combination for metabolic cancer therapy. *BioMed Res Int.* (2015) 2015:690492. doi: 10.1155/2015/690492
- Ostrowski A, van Aalten DMF. Chemical tools to probe cellular O-GlcNAc signalling. *Biochem J.* (2013) 456:1–12. doi: 10.1042/BJ20131081
- Lee TN, Albhorn WE, Knierman MD, Konrad RJ. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006) 350:1038–43. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.155
- Trapannone R, Rafie K, van Aalten DMF. O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochem Soc Trans.* (2016) 44:88–93. doi: 10.1042/BST20150189
- Advani Shyam B, Sam J. Potential anticancer and antiviral agents. Substituted 3-[1'(2',3',4'-tri-O-benzoyl-β-d-ribofuranosyl)]-2-benzoxazolinones. *J Heterocycl Chem.* (1968) 5:119–22. doi: 10.1002/jhet.5570050123
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* (2010) 29:2831–42. doi: 10.1038/ncr.2010.41
- Itkonen HM, Minner S, Guldvik JJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, et al. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* (2013) 73:5277–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0549
- Jiang J, Lazarus MB, Pasquina L, Sliz P, Walker S. A neutral diphosphate mimic crosslinks the active site of human O-GlcNAc transferase. *Nat Chem Biol.* (2011) 8:72–7. doi: 10.1038/nchembio.711
- Celiberto LS, Chan JY, Law HT, Bhullar K, Xia L, Cavallini DC, et al. A10 core-1 derived o-glycosylation of the mucin muc2 plays a key role in host defense against enteric citrobacter rodentium infection. *J Can Assoc Gastroenterol.* (2018) 1:15–6. doi: 10.1093/jcag/gwy009.010
- Hennebicq-Reig S, Lesuffleur T, Capon C, De Bolos C, Kim I, Moreau O, et al. Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *Biochem J.* (1998) 334:283–95.
- Olvera A, Martinez JP, Casadellà M, Llano A, Rosàs M, Mothe B, et al. Benzyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranoside increases human immunodeficiency virus replication and viral outgrowth efficacy in vitro. *Front Immunol.* (2018) 8:2010. doi: 10.3389/fimmu.2017.02010
- Gloster TM, Zandberg WF, Heinonen JE, Shen DL, Deng L, Vocadlo DJ. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol.* (2011) 7:174–81. doi: 10.1038/nchembio.520
- Ma Z, Vosseller K. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. *J. Biol. Chem.* (2014) 289:34457–65. doi: 10.1074/jbc.R114.577718
- Thompson SW, McClure BG, Tubman TRJ. A randomized, controlled trial of parenteral glutamine in ill, very low birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (2003) 37:550–3. doi: 10.1097/00005176-200311000-00008
- van den Berg A, van Elburg RM, Teerlink T, Lafeber HN, Twisk JWR, Fetter WPF. A randomized controlled trial of enteral glutamine supplementation in very low birth weight infants: plasma amino acid concentrations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (2005) 41:66–71. doi: 10.1097/01.mpg.0000167497.55321.65
- Pavelká K, Gatterová J, Olejarová M, Machacek S, Giacovelli G, Rovati LC. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med.* (2002) 162:2113–23. doi: 10.1001/archinte.162.18.2113
- Macauley MS, Vocadlo DJ. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAc. *Carbohydr Res.* (2009) 344:1079–84. doi: 10.1016/j.carres.2009.04.017
- Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ. O-GlcNAc. Uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J Biol Chem.* (2005) 280:25313–22. doi: 10.1074/jbc.M413819200
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAc inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol.* (2008) 4:483–90. doi: 10.1038/nchembio.96
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, van Aalten DMF. GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAc. Inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation. *Biochem J.* (2009) 420:221–7. doi: 10.1042/BJ20090110
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DMF. GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAc. Inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *J Am Chem Soc.* (2006) 128:16484–5. doi: 10.1021/ja066743n
- Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* (1988) 31:337–42. doi: 10.1007/BF02341500
- Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) 293:207–12. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00200-0
- Kang E-S, Han D, Park J, Kwak TK, Oh M-A, Lee S-A, et al. O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic β cells. *Exp Cell Res.* (2008) 314:2238–48. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.04.014
- Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and O-linked glycosylation in early mouse embryos. *Biol Reprod.* (2010) 82:751–8. doi: 10.1095/biolreprod.109.076661
- Marshall S, Nadeau O, Yamasaki K. Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels. *J Biol Chem.* (2004) 279:35313–9. doi: 10.1074/jbc.M404133200
- Duan W, Paka L, Pillarisetti S. Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol.* (2005) 4:16. doi: 10.1186/1475-2840-4-16

40. Little PJ, Drennon KD, Tannock LR. Glucosamine inhibits the synthesis of glycosaminoglycan chains on vascular smooth muscle cell proteoglycans by depletion of ATP. *Arch Physiol Biochem.* (2008) 114:120–6. doi: 10.1080/13813450802033909
41. Borodkin VS, van Aalten DMF. An efficient and versatile synthesis of GlcNAcstatins-potent and selective O-GlcNAcase inhibitors built on the tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine scaffold. *Tetrahedron* (2010) 66:7838–49. doi: 10.1016/j.tet.2010.07.037
42. Chuh KN, Batt AR, Zaro BW, Darabedian N, Marotta NP, Brennan CK, et al. The new chemical reporter 6-alkynyl-6-deoxy-GlcNAc reveals O-GlcNAc modification of the apoptotic caspases that can block the cleavage/activation of caspase-8. *J Am Chem Soc.* (2017) 139:7872–85. doi: 10.1021/jacs.7b02213
43. Groves JA, Maduka AO, O'Meally RN, Cole RN, Zachara NE. Fatty acid synthase inhibits the O-GlcNAcase during oxidative stress. *J Biol Chem.* (2017) 292:6493–511. doi: 10.1074/jbc.M116.760785
44. Han C, Gu Y, Shan H, Mi W, Sun J, Shi M, et al. O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress. *Nat Commun.* (2017) 8:1491. doi: 10.1038/s41467-017-01654-6
45. Hu J, Chen R, Jia P, Fang Y, Liu T, Song N, et al. Augmented O-GlcNAc signaling via glucosamine attenuates oxidative stress and apoptosis following contrast-induced acute kidney injury in rats. *Free Radic Biol Med.* (2017) 103:121–32. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.032
46. Chen Y-J, Huang Y-S, Chen J-T, Chen Y-H, Tai M-C, Chen C-L, et al. Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2015) 56:1506–16. doi: 10.1167/jovs.14-15726
47. Lee HJ, Ryu JM, Jung YH, Lee KH, Kim DI, Han HJ. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 upregulation by O-GlcNAcylation of Sp1 protects against hypoxia-induced mouse embryonic stem cell apoptosis via mTOR activation. *Cell Death Dis.* (2016) 7:e2158. doi: 10.1038/cddis.2015.410
48. Luanpitpong S, Chanthra N, Janan M, Poohadsuan J, Samart P, U-Pratya Y, et al. Inhibition of O-GlcNAcase sensitizes apoptosis and reverses bortezomib resistance in mantle cell lymphoma through modification of truncated bid. *Mol. Cancer Ther.* (2018) 17:484–96. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0390
49. Suh HN, Lee YJ, Kim MO, Ryu JM, Han HJ. Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells. *J Cell Physiol.* (2014) 229:1557–68. doi: 10.1002/jcp.24599
50. He Y, Ma X, Li D, Hao J. Thiamet G mediates neuroprotection in experimental stroke by modulating microglia/macrophage polarization and inhibiting NF- κ B p65 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* (2017) 37:2938–51. doi: 10.1177/0271678X16679671
51. Hwang S-Y, Shin J-H, Hwang J-S, Kim S-Y, Shin J-A, Oh E-S, et al. Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia* (2010) 58:1881–92. doi: 10.1002/glia.21058
52. Shi J, Gu J, Dai C, Gu J, Jin X, Sun J, et al. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Sci Rep.* (2015) 5:14500. doi: 10.1038/srep14500
53. Nöt LG, Marchase RB, Fülöp N, Brocks CA, Chatham JC. Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats. *Shock Augusta Ga* (2007) 28:345–52. doi: 10.1097/shk.0b013e3180487ebb
54. Yang S, Zou L-Y, Bounelis P, Chaudry I, Chatham JC, Marchase RB. Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock Augusta Ga* (2006) 25:600–7. doi: 10.1097/01.shk.0000209563.07693.db
55. Zou L, Yang S, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC. The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock Augusta Ga* (2007) 27:402–8. doi: 10.1097/01.shk.0000245031.31859.29
56. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* (2018) 39:119–77. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393
57. Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am J Physiol-Cell Physiol.* (2007) 292:C178–87. doi: 10.1152/ajpcell.00162.2006
58. Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2008) 294:C1509–20. doi: 10.1152/ajpcell.00456.2007
59. Ngho GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP. O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2009) 297:H1711–9. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2009
60. Ngho GA, Watson LJ, Facundo HT, Jones SP. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* (2011) 40:895–911. doi: 10.1007/s00726-010-0728-7
61. Liu J, Marchase RB, Chatham JC. Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J Mol Cell Cardiol.* (2007) 42:177–85. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.09.015
62. Laczky B, Marsh SA, Brocks CA, Wittmann I, Chatham JC. Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2010) 299:H1715–27. doi: 10.1152/ajpheart.00337.2010
63. Jones SP, Zachara NE, Ngho GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, et al. Cardioprotection by N-Acetylglucosamine Linkage to Cellular Proteins. *Circulation* (2008) 117:1172–82. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.730515
64. Pælestik KB, Jespersen NR, Jensen RV, Johnsen J, Bøtker HE, Kristiansen SB. Effects of hypoglycemia on myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion injury and preconditioning in hearts from rats with and without type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* (2017) 16:148. doi: 10.1186/s12933-017-0628-1
65. Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, Bouvet M, Smet-Nocca C, Janel S, et al. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res.* (2015) 107:56–65. doi: 10.1093/cvr/cvv136
66. Guo X, Shang J, Deng Y, Yuan X, Zhu D, Liu H. Alterations in left ventricular function during intermittent hypoxia: possible involvement of O-GlcNAc protein and MAPK signaling. *Int J Mol Med.* (2015) 36:150–8. doi: 10.3892/ijmm.2015.2198
67. Dassanayaka S, Brainard RE, Watson LJ, Long BW, Brittian KR, DeMartino AM, et al. Cardiomyocyte Ogt limits ventricular dysfunction in mice following pressure overload without affecting hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* (2017) 112:23. doi: 10.1007/s00395-017-0612-7
68. Mailleux F, Gélinais R, Beauloye C, Horman S, Bertrand L. O-GlcNAcylation, enemy or ally during cardiac hypertrophy development? *Biochim Biophys Acta* (2016) 1862:2232–43. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.08.012
69. Cannon MV, Silljé HHW, Sijbesma JWA, Vreeswijk-Baudoin I, Ciapaitė J, van der Sluis B, et al. Cardiac LXR α protects against pathological cardiac hypertrophy and dysfunction by enhancing glucose uptake and utilization. *EMBO Mol. Med.* (2015) 7:1229–43. doi: 10.15252/emmm.201404669
70. Facundo HT, Brainard RE, Watson LJ, Ngho GA, Hamid T, Prabhu SD, et al. O-GlcNAc signaling is essential for NFAT-mediated transcriptional reprogramming during cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2012) 302:H2122–30. doi: 10.1152/ajpheart.00775.2011
71. Gélinais R, Mailleux F, Dontaine J, Bultot L, Demeulder B, Ginion A, et al. AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nat Commun.* (2018) 9:374. doi: 10.1038/s41467-017-02795-4
72. Ledee D, Smith L, Bruce M, Kajimoto M, Isern N, Portman MA, et al. c-Myc alters substrate utilization and O-GlcNAc protein posttranslational modifications without altering cardiac function during early aortic constriction. *PLoS ONE* (2015) 10:e0135262. doi: 10.1371/journal.pone.0135262
73. Lunde IG, Aronsen JM, Kvaløy H, Qvigstad E, Sjaastad I, Tønnessen T, et al. Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure. *Physiol Genomics* (2012) 44:162–72. doi: 10.1152/physiolgenomics.00016.2011

74. Muthusamy S, DeMartino AM, Watson LJ, Brittian KR, Zafir A, Dassanayaka S, et al. MicroRNA-539 is up-regulated in failing heart, and suppresses O-GlcNAcase expression. *J Biol Chem.* (2014) 289:29665–76. doi: 10.1074/jbc.M114.578682
75. Liu B, Wang J, Li M, Yuan Q, Xue M, Xu F, et al. Inhibition of ALDH2 by O-GlcNAcylation contributes to the hyperglycemic exacerbation of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Oncotarget* (2017) 8:19413–26. doi: 10.18632/oncotarget.14297
76. Wang D, Hu X, Lee SH, Chen F, Jiang K, Tu Z, et al. Diabetes exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by down-regulation of microRNA and up-regulation of O-GlcNAcylation. *JACC Basic Transl Sci.* (2018) 3:350–62. doi: 10.1016/j.jaccbs.2018.01.005
77. Ekmark L, Rooyackers O, Wernerman J, Fläring U. Plasma glutamine deficiency is associated with multiple organ failure in critically ill children. *Amino Acids* (2015) 47:535–42. doi: 10.1007/s00726-014-1885-x
78. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med.* (2001) 27:84–90. doi: 10.1007/s001340000703
79. Neu J, Roig JC, Meetze WH, Veerman M, Carter C, Millsaps M, et al. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. *J Pediatr.* (1997) 131:691–9. doi: 10.1016/S0022-3476(97)70095-7
80. Bober-Olesinska K, Kornacka MK. [Effects of glutamine supplemented parenteral nutrition on the incidence of necrotizing enterocolitis, nosocomial sepsis and length of hospital stay in very low birth weight infants]. *Med Wieku Rozwoj.* (2005) 9:325–33.
81. Sevastiadou S, Malamitsi-Puchner A, Costalos C, Skouroliaou M, Briana DD, Antsaklis A, et al. The impact of oral glutamine supplementation on the intestinal permeability and incidence of necrotizing enterocolitis/septicemia in premature neonates. *J Matern-Fetal Neonatal Med.* (2011) 24:1294–300. doi: 10.3109/14767058.2011.564240
82. Houdijk AP, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RI, Weiss JK, McCamish MA, et al. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* (1998) 352:772–6.
83. Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, et al. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med.* (2001) 29:2075–80. doi: 10.1097/00003246-200111000-00006
84. Lomivorotov VV, Efremov SM, Shmirev VA, Ponomarev DN, Lomivorotov VN, Karaskov AM. Glutamine is cardioprotective in patients with ischemic heart disease following cardiopulmonary bypass. *Heart Surg Forum* (2011) 14:E384–8. doi: 10.1532/HSF98.20111074
85. Lomivorotov VV, Efremov SM, Shmirev VA, Ponomarev DN, Svyatchenko AV, Deryagin MN, et al. Does glutamine promote benefits for patients with diabetes mellitus scheduled for cardiac surgery? *Heart Lung Circ.* (2013) 22:360–5. doi: 10.1016/j.hlc.2012.11.011
86. Brinkmann SJH, Buijs N, Vermeulen MAR, Oosterink E, Schierbeek H, Beishuizen A, et al. Perioperative glutamine supplementation restores disturbed renal arginine synthesis after open aortic surgery: a randomized controlled clinical trial. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2016) 311:F567–75. doi: 10.1152/ajprenal.00340.2015
87. Chávez-Tostado M, Carrillo-Llamas F, Martínez-Gutiérrez PE, Alvarado-Ramírez A, López-Taylor JG, Vázquez-Jiménez JC, et al. Oral glutamine reduces myocardial damage after coronary revascularization under cardiopulmonary bypass. *A randomized clinical trial Nutr Hosp.* (2017) 34:277–83. doi: 10.20960/nh.519
88. Khogali SEO, Pringle SD, Weryk BV, Rennie MJ. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* (2002) 18:123–6. doi: 10.1016/S0899-9007(01)00768-7
89. Roman-Blas JA, Castañeda S, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G, CS/GS Combined Therapy Study Group. Combined treatment with chondroitin sulfate and glucosamine sulfate shows no superiority over placebo for reduction of joint pain and functional impairment in patients with knee osteoarthritis: a six-month multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Rheumatol.* (2017) 69:77–85. doi: 10.1002/art.39819
90. Kwok CK, Roemer FW, Hannon MJ, Moore CE, Jakicic JM, Guermazi A, et al. Effect of oral glucosamine on joint structure in individuals with chronic knee pain: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Rheumatol.* (2014) 66:930–9. doi: 10.1002/art.38314
91. de Vos BC, Landsmeer MLA, van Middelkoop M, Oei EHG, Krul M, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Long-term effects of a lifestyle intervention and oral glucosamine sulphate in primary care on incident knee OA in overweight women. *Rheumatol Oxf Engl.* (2017) 56:1326–34. doi: 10.1093/rheumatology/kex145
92. Esfandiari H, Pakravan M, Zakeri Z, Ziaie S, Pakravan P, Ownagh V. Effect of glucosamine on intraocular pressure: a randomized clinical trial. *Eye Lond Engl.* (2017) 31:389–94. doi: 10.1038/eye.2016.221
93. Runhaar J, Rozendaal RM, van Middelkoop M, Bijlsma HJW, Doherty M, Dziedzic KS, et al. Subgroup analyses of the effectiveness of oral glucosamine for knee and hip osteoarthritis: a systematic review and individual patient data meta-analysis from the OA trial bank. *Ann Rheum Dis.* (2017) 76:1862–9. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211149
94. Kongtharvonskul J, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Woratanarat P, Thakkestian A. Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis. *Eur J Med Res.* (2015) 20:24. doi: 10.1186/s40001-015-0115-7
95. Hresko RC, Heimberg H, Chi MM, Mueckler M. Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. *J Biol Chem.* (1998) 273:20658–68. doi: 10.1074/jbc.273.32.20658
96. Medina M. An overview on the clinical development of Tau-based therapeutics. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:1160. doi: 10.3390/ijms19041160
97. Onay-Besikci A. Regulation of cardiac energy metabolism in newborn. *Mol Cell Biochem.* (2006) 287:1–11. doi: 10.1007/s11010-006-9123-9
98. Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Mueckler M. Differential effects of GLUT1 or GLUT4 overexpression on hexosamine biosynthesis by muscles of transgenic mice. *J Biol Chem.* (1996) 271:23197–202. doi: 10.1074/jbc.271.38.23197
99. Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, Tiefenthaler V, Metzler B, Aitman T, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging* (2012) 4:966–77. doi: 10.18632/aging.100526
100. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* (2011) 331:1078–80. doi: 10.1126/science.1200708
101. Uygur A, Lee RT. Mechanisms of cardiac regeneration. *Dev Cell* (2016) 36:362–74. doi: 10.1016/j.devcel.2016.01.018
102. Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med.* (2016) 51:1–15. doi: 10.1016/j.mam.2016.05.005
103. Lefebvre T, Guinez C, Dehennaut V, Beseme-Dekeyser O, Morelle W, Michalski J-C. Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? *Expert Rev Proteomics* (2005) 2:265–75. doi: 10.1586/14789450.2.2.265
104. Fülöp N, Mason MM, Dutta K, Wang P, Davidoff AJ, Marchase RB, et al. Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2007) 292:C1370–8. doi: 10.1152/ajpcell.00422.2006
105. Fülöp N, Feng W, Xing D, He K, Not LG, Brocks CA, et al. Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology* (2008) 9:139. doi: 10.1007/s10522-007-9123-5
106. Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, et al. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS ONE* (2012) 7:e43724. doi: 10.1371/journal.pone.0043724
107. Rex-Mathes M, Werner S, Strutas D, Griffith LS, Viebahn C, Thelen K, et al. O-GlcNAc expression in developing and ageing mouse brain. *Biochimie* (2001) 83:583–90. doi: 10.1016/S0300-9084(01)01305-0
108. Gu J, Shi J, Dai C, Ge J, Zhao Y, Chen Y, et al. O-GlcNAcylation Reduces Ischemia-Reperfusion-Induced Brain Injury. *Sci Rep.* (2017) 7. doi: 10.1038/s41598-017-10635-0
109. Liu S, Sheng H, Yu Z, Paschen W, Yang W. O-linked β -N-acetylglucosamine modification of proteins is activated in post-ischemic brains of young but not aged mice: implications for impaired functional recovery

- from ischemic stress. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2016) 36:393–8. doi: 10.1177/0271678X15608393
110. Wang AC, Jensen EH, Rexach JE, Vinters HV, Hsieh-Wilson LC. Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:15120–5. doi: 10.1073/pnas.1606899113
 111. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, Cook D, Jones G, Albert M, et al. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N Engl J Med.* (2013) 368:1489–97. doi: 10.1056/NEJMoa1212722
 112. Ward E, Picton S, Reid U, Thomas D, Gardener C, Smith M, et al. Oral glutamine in paediatric oncology patients: a dose finding study. *Eur J Clin Nutr.* (2003) 57:31–6. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601517
 113. Griffin ME, Jensen EH, Mason DE, Jenkins CL, Stone SE, Peters EC, et al. Comprehensive mapping of O-GlcNAc modification sites using a chemically cleavable tag. *Mol Biosyst.* (2016) 12:1756–9. doi: 10.1039/C6MB00138F
 114. Deracinois B, Camoin L, Lambert M, Boyer J-B, Dupont E, Bastide B, et al. O-GlcNAcylation site mapping by (azide-alkyne) click chemistry and mass spectrometry following intensive fractionation of skeletal muscle cells proteins. *J Proteomics* (2018) 186:83–97. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.005
 115. Wang Y, Zhu J, Zhang L. Discovery of cell-permeable O-GlcNAc transferase inhibitors via tethering in situ click chemistry. *J Med Chem.* (2017) 60:263–72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01237
 116. Gross BJ, Kraybill BC, Walker S. Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *J Am Chem Soc.* (2005) 127:14588–9. doi: 10.1021/ja0555217
 117. Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* (2011) 469:564–7. doi: 10.1038/nature09638
 118. Ortiz-Meoz RF, Jiang J, Lazarus MB, Orman M, Janetzko J, Fan C, et al. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem Biol.* (2015) 10:1392–7. doi: 10.1021/acschembio.5b00004
 119. Wang Z, Pandey A, Hart GW. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* (2007) 6:1365–79. doi: 10.1074/mcp.M600453-MCP200
 120. Wang P, Lazarus BD, Forsythe ME, Love DC, Krause MW, Hanover JA. O-GlcNAc cycling mutants modulate proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2012) 109:17669–74. doi: 10.1073/pnas.1205748109

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Ferron, Denis, Persello, Rathagiri and Lauzier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Review Article

New Approaches to Identify Sepsis Biomarkers: The Importance of Model and Sample Source for Mass Spectrometry

Angélique Blangy-Letheule,¹ Antoine Persello,^{1,2} Bertrand Rozec ,¹ Michel De Waard ,^{1,3} and Benjamin Lauzier ¹

¹Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

²InFlectis BioScience, Nantes, France

³Labex ICST, Valbonne, France

Correspondence should be addressed to Benjamin Lauzier; benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

Received 13 October 2020; Revised 17 November 2020; Accepted 27 November 2020; Published 24 December 2020

Academic Editor: Luc Demaison

Copyright © 2020 Angélique Blangy-Letheule et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Septic shock is a systemic inflammatory response syndrome associated with circulatory failure leading to organ failure with a 40% mortality rate. Early diagnosis and prognosis of septic shock are necessary for specific and timely treatment. However, no predictive biomarker is available. In recent years, improvements in proteomics-based mass spectrometry have improved the detection of such biomarkers. This approach can be performed on different samples such as tissue or biological fluids. Working directly from human samples is complicated owing to interindividual variability. Indeed, patients are admitted at different stages of disease development and with signs of varying severity from one patient to another. All of these elements interfere with the identification of early, sensitive, and specific septic shock biomarkers. For these reasons, animal models of sepsis, although imperfect, are used to control the kinetics of the development of the pathology and to standardise experimentation, facilitating the identification of potential biomarkers. These elements underline the importance of the choice of animal model used and the sample to be studied during preclinical studies. The aim of this review is to discuss the relevance of different approaches to enable the identification of biomarkers that could indirectly be relevant to the clinical setting.

1. Introduction

Sepsis and septic shock are common causes for admission to intensive care units. Sepsis is defined as organ dysfunction resulting from a deregulated host response to infection [1]. In 2017, this pathology affected 48.9 million people worldwide, resulting in the deaths of 11 million patients [2]. Over the last 50 years, studies have demonstrated that myocardial dysfunction is a common finding in septic patients and approximately 50% of septic patients present signs of myocardial decompensation with variable development kinetics depending on the patient resulting in excess mortality of more than 60% [3]. Oxygen delivery is impaired in the tissues of sepsis patients with organ dysfunction. Septic shock is the most severe manifestation of sepsis. It is characterized by persistent hypotension, associated with metabolic dysfunction and significant tissue suffering. A 10% increase in mortality

is associated with septic shock for each additional hour of delay between the diagnosis and the implementation of an adequate treatment in hospital settings [4]. Since 2017, the World Health Organization (WHO) has made sepsis one of the world's top priorities and has adopted resolutions to improve the prevention, diagnosis, and management of this disease [5]. Septic shock is a complex and multifactorial pathology presenting a great heterogeneity of clinical manifestations. This therefore explains the differences in the kinetics of organ dysfunction and complicates its early diagnosis and appropriate management. Timely management could save 80% of patients with sepsis [6]. The use of early biomarkers and therapeutic targets that are sensitive and specific to the evolution of the pathology would facilitate rapid diagnosis and therefore early management of patients, limiting organ dysfunctions, particularly cardiac dysfunction, and optimizing patient chances of survival. Over the last few

years, numerous studies have proposed new biomarkers (Table 1). It should be noted that it is easier to standardise experimentation and control the kinetics of the evolution of the pathology in animal studies. It is then possible to, respectively, limit both the phenotypic heterogeneity between individuals and identify early versus late biomarkers. Over the past 20 years, a large number of biomarkers and therapeutic targets related to sepsis have been proposed [7]. However, the inherent heterogeneity of the pathology and the absence of similar reference bases in the different studies have made it difficult to confirm the quality and accuracy of these biomarkers for the diagnosis of sepsis [8]. For research teams working on sepsis, it is therefore important to implement improved investigation methods to generate better results and more reliable biomarkers. In recent years, omics technologies have gained momentum and increasing significance with improved splitting techniques and instrument performance. Analytical approaches have made it possible to identify proteins of low abundance in complex samples thereby improving the identification of new biomarkers. Proteomics based on mass spectrometry (MS) enable the use of different samples such as biological tissues or fluids based on patient cohorts or animal models in order to identify biomarkers and/or therapeutic targets. In the context of septic shock, the ideal biomarker should possess the following qualities: (i) be measurable during the early phase of the pathology, (ii) be easy to detect, (iii) be inexpensive, and (iv) be sufficiently sensitive and specific. The choice of the model and the relevance of the biological samples analysed by proteomics are essential for the identification of clinically usable biomarkers. This review seeks to discuss the quality and properties of different models that will enable the potential identification of clinically relevant biomarkers.

2. Mass Spectrometry for the Identification of Sepsis Biomarkers

MS is a very powerful and sensitive analytical method that identifies and quantifies molecules by measuring their mass. MS can provide information on several identified molecules at a time using a targeted approach or hundreds or even thousands of compounds via a nontargeted approach. Nontargeted MS approaches are typically used in the discovery phases to compare samples from two or more different populations. Once a compound that is present at a differential amount between these populations has been identified, a targeted approach can be used at a later stage to characterise the suspected biomarker(s) in a focused manner (Figure 1). Herein, only nontargeted mass spectrometry will be described since it provides identification of a larger set of biomarkers.

In recent years, improvements in selective depletion techniques, splitting techniques, mass spectrometry instrumentation, and analytical approaches have improved proteome analysis. This has led to a better understanding of molecular processes involved in many disease states and to the identification of new biomarkers. An example of the search for diagnostic markers by proteomic analysis is the detection in

TABLE 1: Nonexhaustive table of potential biomarkers recently studied.

	Biomarkers	References
Inflammation	S100A8	[9]
	High-mobility group box 1	[10]
	C-reactive protein	[11]
	Presepsin	[12]
Acute phase response	Haptoglobin	[13]
	Serum amyloid A	[14]
	Pentraxin-3	[7]
Lipid metabolism	Serum paraoxonase	[15]
	Apolipoprotein A-V	[16]
Oxidative stress	Glutathione peroxidase 3	[17]
	Histidine-rich glycoprotein	[18]

cerebrospinal fluid of the protein 14-3-3 σ as a marker of the Creutzfeldt-Jakob disease [19].

2.1. MS-Based Proteomics. The study of proteins gained increased maturity in the 1990s with the advent of MS. Over the last ten years, this technique has become an almost indispensable approach for research of diagnostic and prognostic biomarkers as well as for monitoring the development of pathologies. Proteomic studies can be carried out on different samples such as tissues or various biological fluids such as urine or blood. Indeed, they have already been used to identify a panel of metabolites for the stratification of patients suspected of developing sepsis [11]. However, the biological samples selected for identification of biomarkers should be considered carefully. The pathophysiology of sepsis and associated clinical constraints such as accessibility to biological tissue could limit the identification of biomarkers. It is therefore necessary to select the type of sample to be studied during preclinical work to enable identification of biomarkers that are relevant to the clinical setting.

2.1.1. The Search for Biomarkers in Organs. In sepsis, the inflammatory response can lead to damage and failure of organs such as the lungs, heart, or kidneys which are associated with excess mortality. The underlying mechanisms are not well understood, and without adapted diagnostic or prognostic biomarkers, the pathology will evolve toward septic shock and potentially death. In order to search for such biomarkers, several studies have focused on the proteome of organs that were damaged during sepsis itself by performing and studying biopsies. For example, a study on the temporal profile of renal proteome changes induced by sepsis highlighted that ceruloplasmin (CR) and haptoglobin (Hp) are upregulated 90 minutes after the onset of sepsis [20]. Similarly, a cardiac tissue proteome study reported that the oligomerization of pentraxin-3 (PTX-3) increased in patients who did not survive sepsis [21]. The octameric PTX-3 level in patients with sepsis could therefore be predictive of an unfavourable clinical state. In all of these studies, MS, performed on tissue, made it possible to identify proteins that

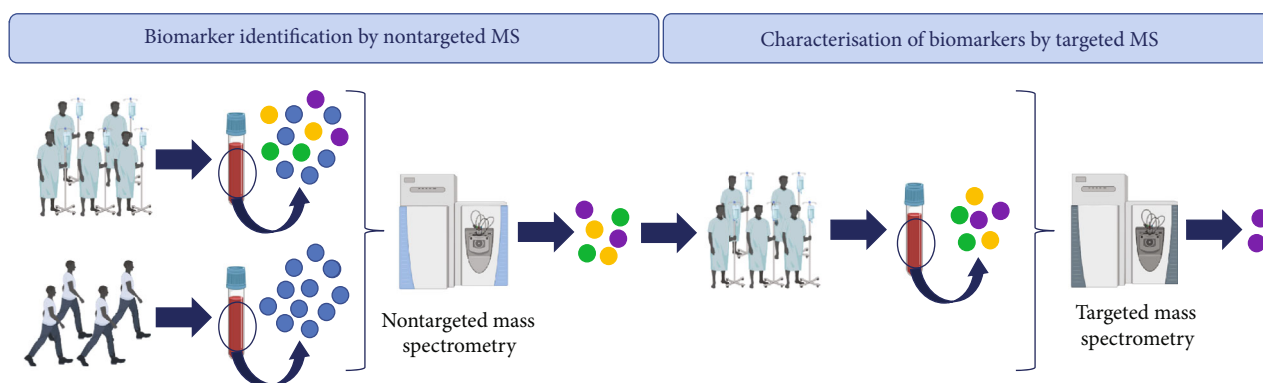


FIGURE 1: Process implemented in the search for MS-based biomarkers of septic shock. Potential biomarkers are first analysed by nontargeted MS and then characterised by targeted MS.

are deregulated during sepsis. These proteins could serve as biomarkers or therapeutic targets specific to a tissue/organ during sepsis. However, potential biomarkers identified by MS must be clinically usable to assist in medical decision-making. Indeed, the study of a tissue requires a biopsy, an invasive procedure, therefore limiting its use for routine biomarker research in clinics (Table 2). As a result, research has shifted toward the study of biological fluids that are more easily accessible in a clinical setting, and in particular, routinely used in clinics for other pathologies [22].

2.1.2. The Search for Biomarkers in Exosomes. Exosomes are membrane vesicles found in many biological fluids (such as blood or urine) that transmit signals between cells [23]. In the urine, the number of exosomes and extracellular vesicles increases continuously between 6 and 48 hours after induction of sepsis, suggesting that they could be potentially involved in this pathology [24]. It has been shown that exosomes play a role in sepsis through the interaction of various compounds released by the septic condition on membrane receptors. Proteomic analyses of exosomes in patient plasma samples could be an effective approach for the identification of protein biomarkers to be used for the diagnosis of sepsis. A study of exosomes in plasma from patients with sepsis identified 238 proteins [25]. Among these proteins, a negative correlation between serine palmitoyltransferase 3 (SPTLC 3) and the progression profile of the pathology was demonstrated, suggesting that SPTLC 3 could play a role in the development of sepsis [23]. SPTLC 3 enables the synthesis of ceramide from palmitate and serine. Studies have shown that sepsis leads to an increase in ceramide levels which play a role in sepsis-induced cardiac dysfunction [25]. Thus, the increase in SPTLC 3 could predict cardiac dysfunction in patients with sepsis. However, it should be noted that the preparation of exosomes is a cumbersome process. The search for biomarkers from exosomes is therefore not the best strategy in the case of sepsis since diagnosis cannot be made rapidly enough. Rapid diagnosis is a key criterion in this pathology to limit the mortality associated with the disease (Table 2).

Most studies to detect biomarkers have focused on the proteome which is defined as set of proteins in a cell compartment, cell, or tissue. More recently, much work has

focused on proteins in plasma, serum, or urine. It would therefore be more appropriate in this case to use the term “secretome” which is defined as the set of proteins secreted or liberated by a cell, tissue, or organism at a given time and under given conditions, which would explain their presence in biological fluids [26].

2.2. “Secretomics.” Secretome is a dynamic and complex entity that varies according to cell type or organism, functional state, and time. Indeed, depending on the stimuli they receive, the proteins released by a given cell may vary. For example, during an infection, the high-mobility group box 1 (HMGB1), which belongs to the alarmin family, is released into the extracellular space and participates in the pathogenesis of sepsis [10]. Thus, any alteration in the release of a given protein and the abundance of such a protein in a given environment could reflect a pathological state [27]. Although the term secretome was first mentioned in 2000 in a study by Tjalsma et al. on the proteins secreted by the bacterium *Bacillus subtilis*, the concept of circulating factors in plasma/serum is older [28]. Parillo et al. showed 35 years ago that the transfer of serum from patients in septic shock to rat healthy cardiomyocytes induces a decrease in both the extent and velocity of shortening during contraction. This work demonstrated the existence of circulating blood factors favouring myocardial depression during septic shock in humans [29]. More recently, Mastronardi et al. studied this concept and reported that intravenous administration of “microparticles” present in the plasma of patients in septic shock at an early stage leads to increased expression of proinflammatory proteins such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the heart and lungs [30]. In the same year, a study by van Hees et al. demonstrated that the transfer of plasma from patients in septic shock to skeletal muscle tissue leads to a loss of myosin from skeletal myocytes. The factors that contribute to such muscle weakness are released during sepsis. Proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , interferon- γ , or interleukin-1 β (IL-1 β) are known to be involved in muscle degeneration pathologies [31]. In this study, they showed that the plasma level of IL-6 correlates with the severity of myosin loss. However, it was also found that the addition of IL-6 alone to control plasma is not associated with muscle atrophy [31]. Hence, these results suggest that additional

TABLE 2: Summary of the advantages and disadvantages, in the context of sepsis, for proteomic analyses of each sample source described.

Samples	Tissues/organs 	Biological fluids 			Exosomes
	Kidney/heart	Plasma	Serum	Urine	
Advantages	(i) Study of the desired organ.	(i) Poorly invasive (ii) Inexpensive analyses	(i) Poorly invasive (ii) Inexpensive analyses	(i) Noninvasive	(i) Poorly invasive (ii) Provides information on the state of the cells
Disadvantages	(i) Not clinically applicable (ii) Biopsies difficult to obtain (iii) Highly invasive	(i) Wide range of concentrations	(i) Time of analysis (ii) Wide range of concentrations (iii) Loss of proteins associated with coagulation	(i) Poorly reproducible in clinics	(i) Time of analysis

circulating factors in addition to IL-6, not currently identified, are also involved in the transmission and/or amplification of the pathological phenotype according to mechanisms that remain to be defined. The study of proteins that constitute the secretome could lead to a better understanding of the mechanisms underlying septic shock in addition to facilitating the identification of a number of biomarkers or a combination of them (coming as a signature) in the early phase of this pathology. However, analysis of the secretome is rendered difficult by the dynamic range of protein expression which is a major technical difficulty in proteomic studies. For example, plasma contains a wide dynamic range of more than ten orders of magnitude. As a result, 90% of the proteins contained in the plasma consist of only 10 well-identified proteins such as albumin, immunoglobulin, or transferrin [11]. This wide dynamic range of concentrations makes it particularly difficult to analyse proteins of low abundance by MS, thereby hindering the identification of new biomarker candidates. To avoid this, strategies for selective depletion of abundant proteins have been developed to facilitate analyses of the secretome and identify new biomarkers from biological fluids.

2.2.1. Selective Depletion Techniques. Various approaches for processing proteomic samples have been developed in recent years to reduce the complexity of biological samples, including selective depletion. During proteomic analyses, these techniques enable detection of the signal of low abundance proteins in a complex protein sample by reducing the dynamic concentration range of the proteins. Two approaches are particularly used: immunodepletion and ProteoMiner™. The immunodepletion technique is simply based on a pulldown thanks to the interaction between an antibody and a protein in the sample. The choice of antibody or antibodies is based on knowledge of the proteins studied [32]. The immunodepletion process can easily be performed on plasma or serum samples. However, immunodepletion can cause protein-protein interactions, resulting in depletion of nontargeted proteins [33]. In addition, the high cost of sample preparation prevents this method from being routinely used in clinical settings. Contrary to immunodepletion, ProteoMiner™ does not use antibodies. It is based on the interac-

tion of a high combination of 6-amino acid peptide sequences, called hexapeptides, with the proteins from the sample. These sequences are randomly generated so that all of the proteins in the sample will be able to interact with one or more hexapeptides. Since the binding capacity of hexapeptides is limited, a significant fraction of the highly abundant proteins is eliminated during the wash phase. The proteins bound to the hexapeptides will then be recovered during the elution phase for MS analyses [34]. This technique therefore appears to be particularly appropriate for nontargeted analysis. The biggest inconvenience of using ProteoMiner™ is most probably that the probability of catching small molecular weight proteins or peptides is much lower than larger molecular weight proteins, implying that it has a cut-off efficacy for lower molecular weight proteins (approximately 2 kDa). Hence, the technique is not as good for analysing the relative abundance of cytokines despite their being relevant targets in septic shock.

2.2.2. Detection of Biomarkers in Urine. Since biopsies are not appropriate for the detection of early biomarkers in clinical investigations for sepsis, several studies have turned to urine analyses. The collection of urine samples is noninvasive, unlike blood samples.

The search for early biomarkers in human urine samples has identified 39 deregulated proteins in urine from septic patients. Among these proteins, levels of β -2-microglobulin (B2M) and α -1-antitrypsin (SERPINA1) are increased during sepsis-induced acute kidney injuries (AKI) while levels of α fibrinogen (FGA) chains are decreased. The combination of these markers could therefore predict the onset of AKI [35]. In a recent study, 123 deregulated proteins were detected in urine samples from rats in sepsis or sepsis patients. Among these targets, the acidic nucleic protein deglycase DJ-1 (PARK7) and cadherin 16 (CDH16) were found in samples from both models. This study also showed that the diagnostic sensitivities and specificities of PARK7 and CDH16 were greater than that of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), which is currently used to diagnose AKI [24]. Thus, these two proteins could potentially be considered as early biomarkers of sepsis-induced AKI. Study of the urinary proteome provides identification of potential

biomarkers or therapeutic targets of sepsis. However, patients with sepsis have low diuresis, making it difficult to study urinary biomarkers in the clinic (Table 2). Moreover, a large portion of the deregulated proteins could result from kidney damage, suggesting that they could represent late biomarkers instead of early ones. Therefore, the use of blood samples appears to be more appropriate to look for biomarkers allowing for rapid diagnosis and patient follow-up.

2.2.3. Detection of Biomarkers in Blood Samples. Whole blood consists of plasma, cells, erythrocytes, and platelets. Cells contained in the blood are eliminated to obtain plasma and serum which makes their analyses simpler. As a result, MS studies are mainly performed on plasma or serum samples. Therefore, this review will not address the search for biomarkers in whole blood.

(1) Serum. Unlike plasma, serum is devoid of blood cells or fibrinogen. This biological fluid is rich in proteins, easily accessible, and capable of providing dynamic information on the circulatory system and the evolution of the disease. Proteomic analyses of patient sera revealed a combination of ten proteins that are deregulated during sepsis, including antithrombin III (AT-III), clusterin (CLUS), and serum amyloid A-1 (SAA-1) [14]. The latter is increased in the sepsis patient group, indicating a response to inflammation and tissue damage [14]. Similarly, Hayashi et al., who studied the patient proteome over time, showed a significant decrease in haemoglobin beta 1 and 2 chains in the group of patients who did not survive sepsis [36]. These molecules could be markers of sepsis severity. Both studies identified the biomarkers of sepsis in serum. However, there are no common biomarkers between these studies. This can in part be explained by the fact that Hayashi et al. incorporated the concept of kinetics of pathology development into their study which forces one to study the evolution of the secretome and not its state at a given time. Serum samples contain little or no coagulation-associated proteins, but sepsis is also accompanied by coagulation abnormalities [37]. Thus, plasma would make it possible to study proteins involved in the coagulation cascade which would appear to be relevant for biomarker research and potential therapeutic strategy. This makes plasma a more appropriate source for the detection of nontargeted biomarkers or therapeutic targets (Table 2).

(2) Plasma. Proteomic analyses of plasma have been widely used to identify sepsis biomarkers. Conducted over the past 10 years, a number of them have examined plasma proteomic changes in animal models or in patients with sepsis. In 2019, a study on the plasma proteome of a mouse model of sepsis caused by five different pathogens sought to understand the molecular connections that lead to the progression of the pathology. The analysis of the different plasma samples identified a network of 84 proteins. According to bibliographic data, these proteins have already been described as being involved in human sepsis. In addition, the authors showed that these proteins could be separated into functional networks including those involved in immune suppression, vascular homeostasis, coagulation, or the complement cascade

[38]. More recently, a study conducted on plasma from patients with sepsis showed an increase in acetylated truncated S100A8 and S100A9 as well as monooxidized S100A8 in nonsurviving patients with septic shock [9]. The increase in monooxidized S100A8 protein can be explained by the increased production of ROS by neutrophils and monocytes in sepsis or septic shock. This ROS production contributes to organ damage, and the protein S100A8 could also reflect an organic dysfunction. These proteins, which are in the family of alarmins, appear to be potential markers that could improve the management of patients at risk of dying of septic shock.

A major limitation to the use of plasma and serum for biomarker research is that it is not known to what extent different affected tissues alter the composition of plasma during a disease state [39]. Based on the elements developed in this paragraph, it appears that despite the limitations mentioned above, plasma is the most relevant biological sample for the identification of early sepsis biomarkers.

To conclude, mass spectrometry can analyse different types of biological samples to identify candidate sepsis biomarkers. Given the complexity of this pathology and the great heterogeneity between patients, it would seem more appropriate to analyse plasma for a protein combination whose level changes during sepsis. Such a combination would improve the sensitivity and specificity of these potential biomarkers.

The obvious disadvantage of working with human samples is that the kinetics of the pathology's evolution are not controlled and that blood sampling occurs at various stages of disease progression. Indeed, some patients will present a reduced early phase and will very quickly develop complications such as organ dysfunction associated with the pathology. Others will develop such complications later or not at all. This heterogeneity interferes with the identification of "ideal" biomarkers—in other words early, sensitive, and specific to the pathology. Therefore, many studies have focused on animal models as a first step.

3. Animal Models

Animal models of sepsis have been developed to reproduce the haemodynamic and molecular changes that occur in human sepsis. By studying the evolution of the pathology, these models enable us to understand the underlying mechanisms and thus identify potential biomarkers or therapeutic targets. They have the advantage of being better controlled from the viewpoint of kinetics and interindividual variability. However, the results obtained with the animal model are not always transposable to humans. These elements underline the importance of the choice of the animal model as a rationale for the identification of new biomarkers and in the search for molecules to improve the management of sepsis. The different models of sepsis clearly remain a compromise between standardisation and clinical relevance.

3.1. Nonsurgical Models

TABLE 3: Summary of advantages and disadvantages of animal sepsis models.

	Model	Advantages	Disadvantages
 Nonsurgical	Exogenous molecules	(i) Normalisation of the injected dose and route of administration (ii) Reproduces myocardial alterations	(i) Different cytokinetics (ii) Does not reflect the complexity of human pathophysiological responses
	Bacteria	(i) Normalisation of bacteria dose (ii) Production of different infectious sites	(i) Brutal injection of bacteria (ii) Poorly reproduces the response caused by sepsis
	Caecal slurry	(i) Simple to achieve (ii) Standardisation of the injected dose and route of administration (iii) Reproducible (iv) Similar response to human sepsis	(i) Lack of hindsight on this model (ii) Model exceedingly difficult to implement
	Implantation	(i) Controllable and reproducible model (ii) Progressive systemic diffusion (iii) Limited death incidence	(i) One bacterial strain used (ii) Complicated model to set up
 Surgical	CLP	(i) Improved clinical relevance (ii) Severity variable according to needle diameter, number of punctures and length of ligated caecum	(i) Develops acute sepsis or intra-abdominal abscess (ii) Not controllable (iii) Dependent on experimenter (iv) Not very reproducible (v) Long to set up
	CASP	(i) Adjustable sepsis severity according to the diameter of the stent	(i) Continuous bacterial release (ii) Dependent on experimenter (iii) Long to set up
	CLI	(i) Polymicrobial model of sepsis (ii) Progressive systemic diffusion	(i) High death incidence (ii) Dependent on experimenter (iii) Poorly reproducible (iv) Long to set up

Adapted from the work of Murando et al. [50]. CLP: caecal ligation and puncture; CLI: caecal ligation and incision; CASP: colon ascendant stent peritonitis.

(1) *Injection of Exogenous Molecules.* In these models, bacterial products or endotoxins, injected intravenously (iv) or intraperitoneally (ip), replace the bacteria. They are simple to use, robust, and reproducible models. The most used molecules are lipopolysaccharides (LPS), deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), or synthetic oligodeoxynucleotides containing unmethylated CpG units (ODN-CpG). These patterns can be standardised by normalising the injected doses. Endotoxin-treated animals therefore present a clinical picture that is similar to sepsis with systemic arterial hypotension; impaired myocardial contractility; and increased circulating levels of lactate, tumour necrosis factor (TNF), and interleukin-6 (IL-6) [40–42]. However, the kinetics of sepsis development observed in endotoxemic shock do not mimic those observed in the patient. Indeed, it has been shown that after endotoxin injection, a strong and rapid increase in several proinflammatory cytokines was observed in mouse models in contrast to the smaller and progressive increase in sepsis patients [43]. Finally, endotoxemic models are characterized by the injection of LPS from a single bacterial strain with no initial infectious focus. LPS are mainly recognized at the extracellular stage by Toll-like receptors (TLRs) and by TLR4. The activation of these receptors will stimulate the pathways associated with inflammation, notably through the activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) which regulates the transcription of numerous cytokines [44]. However, septic shock is, in most cases, caused by a

polymicrobial infection that activates multiple signalling pathways. Although exogenous injection models are the most widely used according to the literature, they do not completely reproduce the characteristics of sepsis in humans (Table 3).

(2) *Injection of Bacteria.* To reduce the limitations of the models described above, models for injecting live and dead bacteria have been developed. Bacteria can be administered by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, or intratracheal injection. The use of whole bacteria exposes the organism to numerous bacterial components that can activate different receptors in the host and contributes to the complexity of these models. These models, which are simple to set up, make it possible to generate different infectious sites. These models can be used to reproduce pneumosepsis, urosepsis, or peritonitis [45, 46]. The caecal slurry peritonitis model, used in the study of paediatric sepsis in particular, consists in injecting the caecal contents of other animals, including humans, to induce polymicrobial sepsis in the animals studied [47]. The model's advantage is that bacterial injection can be standardised by normalising the titre administered and the site and time of administration. Animals that received the bacteria presented alterations in myocardial contractility and haemodynamic and physiological changes that are associated with sepsis in humans [48]. However, these models involve the administration of high doses of

bacteria to overcome host defences which effectively eliminates low doses of bacteria. These high doses will not interact with the host as in regular infection and for instance will not colonise the peritoneal cavity. Hence, this approach is not identical and will not accurately reproduce the host response which is often due to the rapid lysis of bacteria by the complement system [49]. In addition, the clinical relevance of these exogenous models could be affected by the bacterial load, the virulence of the strain of bacteria used, or the site of infection (Table 2).

3.2. Surgical Models. Surgical models are much more complex to set up, yet they create a more representative infectious site that better simulates a pathophysiological systemic immune response such as peritonitis.

(1) Implantation Model. Described in 1970, the implantation of a fibrin clot containing a standardised number of bacteria in the peritoneal cavity allows for the progressive release of the bacteria into the bloodstream (Table 3). Studies have shown that this model generates myocardial depression and a cytokine response similar to those observed in humans [51]. However, the use of a single organism in the fibrin clot is subject to the same criticisms as the injection of bacterial cultures with respect to clinical relevance (Table 3). In addition, this model requires major surgery to implant a fibrin clot in the peritoneal cavity with variable host response. The peritonitis model is therefore the currently preferred model.

(2) Model of Peritonitis. The peritonitis model has been widely used over the past 30 years to study the pathogenesis and therapeutic targets of sepsis [52]. This model involves the induction of intestinal lesions that cause microbial flora leakage into the normally sterile peritoneal cavity. For this purpose, caecal ligation and puncture (CLP), caecal ligation and incision (CLI), or colon ascendant stent peritonitis (CASP) can be performed [52, 53]. In all three models, the caecum, which contains a wide variety of bacteria, is perforated by one or more needle punctures (CLP), incision (CLI), or the introduction of a stent into the ascending colon distal to the ileocaecal valve (CASP). In the CLP and CLI models, the haemodynamic, metabolic, immunological, and apoptotic responses, characteristic of organ dysfunction, are more similar to those of human sepsis, which supports the validity of this model [53, 54]. The study of plasma biomarkers also indicates that CLP is clinically relevant [55]. In this model, the severity of sepsis can be modulated by the proportion of ligated caecum, their size, and the number of punctures. However, this aspect also represents a weakness of these models because the procedure is experimenter-dependent, resulting in a lack of reproducibility within and between different research groups. Furthermore, CLI is associated with remarkably high mortality. To more accurately reproduce a case of peritonitis following intestinal perforation in humans, the CASP model has been developed [50, 56]. This model is generated by the insertion of a stent,

which limits blood flow without stopping it. The CASP model limits necrosis and the associated responses and generates diffuse peritonitis with a continuous bacterial translocation from the bowel to the peritoneal cavity. It leads to organ dysfunction as in the CLP and CLI models or septic patients. With this model, the severity of sepsis is adjustable according to the diameter of the stent and mortality is also associated with stent size [57]. The main limitation of these surgical models is that they are very poorly reproducible, so although they better represent the pathology, their use remains complex and limited (Table 2). In addition, the microbiota varies from one model to another and may interfere with the identification of candidate biomarkers. All of these data tend to place the CPL model as the most adequate model to model sepsis.

3.3. Limits Associated with the Animal Model. The sepsis models described above have been used with the animal models. To date, the mouse model remains the most widely used because it is less expensive and has a wider range of reagents available for biochemical studies compared with other species. Laboratory animals are chosen to have similar gene heritage, age, weight, and nutritional status, which does not reflect the heterogeneity among humans. Secondly, the mouse model does not have the same immune system as humans, resulting in a different form of resistance to infection than humans (Table 4). Pigs or sheep, which are more susceptible to infection, could therefore be more relevant [50]. No attempt has been made to introduce best practices, management guidelines, and standardisation in sepsis research, creating confusion with conflicting data resulting from variations in the definition of sepsis or the duration of study [58]. The animal models set up and the samples analysed as well as the time taken to collect these samples vary from one study to another. The lack of standardisation of preclinical data makes it difficult to use the results to identify potential biomarkers or therapeutic targets [59].

In this context, one could suggest withdrawing preclinical animal models. Nevertheless, it is recognized that, for instance, many of the pathways of acute inflammation have been elucidated by the rodent CLP model, considered as a pertinent polymicrobial model [60]. In addition, by refining the animal model of sepsis—i.e., by “humanising” animal diet and microbiome, by studying animals of various ages and both sexes in the presence or absence of underlying chronic comorbidities, and incorporating the basic treatment (fluids, antibiotics)—it could be possible to evaluate models of sepsis and septic shock pathological conditions closer to those of human cases with more relevance such as septic cardiomyopathy [61]. Finally, the “online” translational comparison with biological samples harvested from patients in septic shock will make it possible to confirm or overrule the relevance of a therapeutic target.

4. Conclusion/Discussion

The use of “secretomics”/proteomics based on MS has led to the identification of many promising biomarkers for the early diagnosis of sepsis and the prevention of organ

TABLE 4: Summary of the major differences between humans and the most used animal models of septic shock.

	Human	Mouse	Rat
			
Heart rhythm 	70 bpm	500-700 bpm	250-400 bpm
Respiratory rhythm 	12-20/min	100-200/min	70-110/min
Surface ratio of small intestine/colon 	18	400	400
Endotoxin	High sensitivity	High resistance	High resistance
Main protein in acute phase	CRP	SAP	SAP
Immune system	Neutrophils	Lymphocytes	Lymphocytes
Largest fraction of blood cells	High plasma activity	Poor plasma activity	Poor plasma activity
Complement system			

Adapted from the work of Cavaillon et al. [62]. Bpm: beats per minute; CRP: C-reactive protein; SAP: serum amyloid protein.

dysfunction, particularly cardiac dysfunction. However, the validity and clinical utility of many of these biomarkers have not been tested. In clinical practice, these biomarkers must be validated to human cases of sepsis. They should then be routinely usable, in other words, they must be rapidly quantifiable and relatively cheap. Anyway, MS analyses from biological fluids appear to be more transferable to the clinical setting. Since January 2015, 1,495 studies have focused on the use of biomarkers for the diagnosis of sepsis [7]. The lack of early and specific biomarkers of sepsis and septic shock could be partly related to the fact that there are several limitations in proteomic studies that hinder the identification of clinically usable biomarkers. Indeed, although studies use proteomics to identify new biomarkers, they differ in the experimental protocol used. All of these differences result in proteomic signatures that vary from one study to another. The lack of standardisation of preclinical data makes it difficult to use the results to identify clinically relevant biomarkers. It is therefore crucial that research teams standardise their experience to provide better comparisons of results from one laboratory to another, increasing the quantity of data and limiting the heterogeneity that results from the pathology.

Data Availability

The data supporting this review are from previously reported studies and datasets, which have been cited.

Conflicts of Interest

Authors declare that no conflicts of interest exist.

Authors' Contributions

A. Blangy-Letheule drafted the review. A. Persello reviewed the article for intellectual content. B. Rozec, M. De Waard, and B. Lauzier reviewed the article for intellectual content and gave final approval of the version or any revised version to be submitted. Bertrand Rozec, Michel De Waard, and Benjamin Lauzier codirected this work.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche through a grant to the laboratory of excellence "Ion Channels, Science, and Therapeutics" (Grant No. ANR-11-LABX-0015). We also thank the financial support of Inserm and the "Région Pays de la Loire" with a "New Team" grant to M. De Waard. This work was also directly supported by "Agence Nationale de la Recherche" (20-ASTC-0032-01-HEROISME) (Paris, France).

References

- [1] M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour et al., "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)," *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 801–810, 2016.
- [2] K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa et al., "Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study," *The Lancet*, vol. 395, no. 10219, pp. 200–211, 2020.
- [3] M. Ferron, J. Cadiet, A. Persello et al., "O-GlcNAc stimulation: a new metabolic approach to treat septic shock," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 18751, 2019.
- [4] A. Trzeciak, A. P. Pietropaoli, and M. Kim, "Biomarkers and associated immune mechanisms for early detection and

- therapeutic management of sepsis,” *Immune Network*, vol. 20, no. 3, 2020.
- [5] K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F. R. Machado, R. D. Schachter, and S. Finfer, “Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution,” *New England Journal of Medicine*, vol. 377, no. 5, pp. 414–417, 2017.
 - [6] E. Harberts, T. Liang, S. H. Yoon et al., “Toll-like receptor 4-independent effects of lipopolysaccharide identified using longitudinal serum proteomics,” *Journal of Proteome Research*, vol. 19, no. 3, pp. 1258–1266, 2020.
 - [7] A. Teggert, H. Datta, and Z. Ali, “Biomarkers for point-of-care diagnosis of sepsis,” *Micromachines*, vol. 11, no. 3, p. 286, 2020.
 - [8] C. A. Siloși, I. Siloși, V. Pădureanu et al., “Sepsis and identification of reliable biomarkers for postoperative period prognosis,” *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, vol. 58, 2018.
 - [9] C. Dubois, D. Payen, S. Simon et al., “Top-down and bottom-up proteomics of circulating S100A8/S100A9 in plasma of septic shock patients,” *Journal of Proteome Research*, vol. 19, no. 2, pp. 914–925, 2020.
 - [10] M. Deng, M. J. Scott, J. Fan, and T. R. Billiar, “Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 106, no. 1, pp. 161–169, 2019.
 - [11] K. R. Ludwig and A. B. Hummon, “Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis,” *Molecular BioSystems*, vol. 13, no. 4, pp. 648–664, 2017.
 - [12] M. Y. Memar and H. B. Baghi, “Presepsin: a promising biomarker for the detection of bacterial infections,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 111, pp. 649–656, 2019.
 - [13] M. G. Snipsøyr, H. Wiggers, M. Ludvigsen et al., “Towards identification of novel putative biomarkers for infective endocarditis by serum proteomic analysis,” *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 96, pp. 73–81, 2020.
 - [14] S. Garcia-Obregon, M. Azkargorta, I. Seijas et al., “Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients,” *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 51, no. 4, pp. 465–472, 2018.
 - [15] I. Bednarz-Misa, M. Mierzchala-Pasierb, P. Lesnik et al., “Cardiovascular insufficiency, abdominal sepsis, and patients’ age are associated with decreased paraoxonase-1 (PON1) activity in critically ill patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS),” *Disease Markers*, vol. 2019, Article ID 1314623, 12 pages, 2019.
 - [16] C. Wang, Y. Cui, H. Miao et al., “Apolipoprotein A-V is a novel diagnostic and prognostic predictor in pediatric patients with sepsis: a prospective pilot study in PICU,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2020, 9 pages, 2020.
 - [17] W.-J. Lee, Y.-L. Chen, Y.-W. Chu, and D.-S. Chien, “Comparison of glutathione peroxidase-3 protein expression and enzyme bioactivity in normal subjects and patients with sepsis,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 489, pp. 177–182, 2019.
 - [18] H. Wake, Y. Takahashi, Y. Yoshii et al., “Histidine-rich glycoprotein possesses antioxidant activity through self-oxidation and inhibition of hydroxyl radical production via chelating divalent metal ions in Fenton’s reaction,” *Free Radical Research*, vol. 54, pp. 1–13, 2020.
 - [19] M. Foote and Y. Zhou, “14-3-3 proteins in neurological disorders,” *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 3, no. 2, pp. 152–164, 2012.
 - [20] B. Róka, P. Tod, T. Kaucsár et al., “The acute phase response is a prominent renal proteome change in sepsis in mice,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 1, p. 200, 2020.
 - [21] F. Cuello, M. Shankar-Hari, U. Mayr et al., “Redox state of pentraxin 3 as a novel biomarker for resolution of inflammation and survival in sepsis,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 13, no. 10, pp. 2545–2557, 2014.
 - [22] Q. S. Wells, D. K. Gupta, J. G. Smith et al., “Accelerating biomarker discovery through electronic health records, automated biobanking, and proteomics,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 73, no. 17, pp. 2195–2205, 2019.
 - [23] Y. Xu, X. Ku, C. Wu, C. Cai, J. Tang, and W. Yan, “Exosomal proteome analysis of human plasma to monitor sepsis progression,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 499, no. 4, pp. 856–861, 2018.
 - [24] Y. Li, J. Long, J. Chen et al., “Analysis of spatiotemporal urine protein dynamics to identify new biomarkers for sepsis-induced acute kidney injury,” *Frontiers in Physiology*, vol. 11, 2020.
 - [25] H.-Y. Chung, A. Kollmeier, A. Schrepper et al., “Adjustment of dysregulated ceramide metabolism in a murine model of sepsis-induced cardiac dysfunction,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4, p. 839, 2017.
 - [26] O. K. Kwon, W. Lee, S. J. Kim et al., “In-depth proteomics approach of secretome to identify novel biomarker for sepsis in LPS-stimulated endothelial cells,” *Electrophoresis*, vol. 36, no. 23, pp. 2851–2858, 2015.
 - [27] F. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, and R. Perez-Fernandez, “Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 9, p. 1852, 2017.
 - [28] H. Tjalsma, A. Bolhuis, J. D. H. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijk, “Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 3, pp. 515–547, 2000.
 - [29] J. E. Parrillo, C. Burch, J. H. Shelhamer, M. M. Parker, C. Natanson, and W. Schuette, “A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 76, no. 4, pp. 1539–1553, 1985.
 - [30] M. L. Mastroradi, H. A. Mostefai, F. Mezziani, M. C. Martínez, P. Asfar, and R. Andriantsitohaina, “Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress,” *Critical Care Medicine*, vol. 39, no. 7, pp. 1739–1748, 2011.
 - [31] H. W. H. van Hees, W.-J. M. Schellekens, M. Linkels et al., “Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein,” *Critical Care*, vol. 15, no. 5, p. R233, 2011.
 - [32] S. Xu, J. Jiang, Y. Zhang et al., “Discovery of potential plasma protein biomarkers for acute myocardial infarction via proteomics,” *Journal of Thoracic Disease*, vol. 11, no. 9, pp. 3962–3972, 2019.
 - [33] J. Hajduk, J. Matysiak, and Z. J. Kokot, “Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 458, pp. 84–98, 2016.
 - [34] S. Li, Y. He, Z. Lin et al., “Digging more missing proteins using an enrichment approach with ProteoMiner,” *Journal of Proteome Research*, vol. 16, no. 12, pp. 4330–4339, 2017.

- [35] E. Carrick, J. Vanmassenhove, G. Glorieux et al., "Development of a MALDI MS-based platform for early detection of acute kidney injury," *PROTEOMICS - Clinical Applications*, vol. 10, no. 7, pp. 732–742, 2016.
- [36] N. Hayashi, S. Yamaguchi, F. Rodenburg et al., "Multiple biomarkers of sepsis identified by novel time-lapse proteomics of patient serum," *PLoS One*, vol. 14, no. 9, 2019.
- [37] M. Levi and T. van der Poll, "Coagulation and sepsis," *Thrombosis Research*, vol. 149, pp. 38–44, 2017.
- [38] G. Pimienta, D. M. Heithoff, A. Rosa-Campos et al., "Plasma proteome signature of sepsis: a functionally connected protein network," *Proteomics*, vol. 19, no. 5, article e1800389, 2019.
- [39] E. Malmström, O. Kilsgård, S. Hauri et al., "Large-scale inference of protein tissue origin in gram-positive sepsis plasma using quantitative targeted proteomics," *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, 2016.
- [40] M. P. Fink, "Animal models of sepsis," *Virulence*, vol. 5, no. 1, pp. 143–153, 2013.
- [41] D. Roul, B. Rozec, M. Ferron et al., "B1-adrenergic cardiac contractility is increased during early endotoxemic shock: involvement of cyclooxygenases," *Life Sciences*, vol. 236, article 116865, 2019.
- [42] J. E. Slotta, C. Scheuer, M. D. Menger, and B. Vollmar, "Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage," *Journal of Hepatology*, vol. 44, no. 3, pp. 576–585, 2006.
- [43] D. G. Remick and P. A. Ward, "Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis," *Shock*, vol. 24, Supplement 1, pp. 7–11, 2005.
- [44] H.-J. Kim, H.-I. Joe, Z. Zhang et al., "Anti-inflammatory effect of *Acalypha australis* L. via suppression of NF- κ B signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and LPS-induced septic mice," *Molecular Immunology*, vol. 119, pp. 123–131, 2020.
- [45] S. Knapp, M. J. Schultz, and T. van der Poll, "Pneumonia models and innate immunity to respiratory bacterial pathogens," *Shock*, vol. 24, Supplement 1, pp. 12–18, 2005.
- [46] H. Wu, Z. Wang, S. Zhu et al., "Uroseptic shock can be reversed by early intervention based on leukocyte count 2 h post-operation: animal model and multicenter clinical cohort study," *Inflammation*, vol. 41, no. 5, pp. 1835–1841, 2018.
- [47] M. E. Starr, A. M. Steele, M. Saito, B. J. Hacker, B. M. Evers, and H. Saito, "A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, article e115705, 2014.
- [48] M. J. Lee, K. Kim, Y. H. Jo, J. H. Lee, and J. E. Hwang, "Dose-dependent mortality and organ injury in a cecal slurry peritonitis model," *Journal of Surgical Research*, vol. 206, no. 2, pp. 427–434, 2016.
- [49] J. A. Buras, B. Holzmann, and M. Sitkovsky, "Animal models of sepsis: setting the stage," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, no. 10, pp. 854–865, 2005.
- [50] F. Murando, A. Peloso, and L. Cobianchi, "Experimental abdominal sepsis: sticking to an awkward but still useful translational model," *Mediators of Inflammation*, vol. 2019, Article ID 8971036, 8 pages, 2019.
- [51] C. Natanson, M. P. Fink, H. K. Ballantyne, T. J. MacVittie, and J. J. Conklin, "Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 78, no. 1, pp. 259–270, 1986.
- [52] S. M. K. Kingsley and B. V. Bhat, "Differential paradigms in animal models of sepsis," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 18, no. 9, 2016.
- [53] P. Scheiermann, S. Hoegl, M. Revermann et al., "Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats," *Journal of Surgical Research*, vol. 151, no. 1, pp. 132–137, 2009.
- [54] S. K. Mishra and S. Choudhury, "Experimental protocol for cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis and assessment of vascular functions in mice," in *Traumatic and Ischemic Injury: Methods and Protocols*, B. Tharakan, Ed., pp. 161–187, Springer, New York, NY, USA, 2018.
- [55] J.-L. Li, G. Li, X.-Z. Jing et al., "Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model," *The Journal of International Medical Research*, vol. 46, no. 6, pp. 2410–2422, 2018.
- [56] A. J. Lewis, C. W. Seymour, and M. R. Rosengart, "Current murine models of sepsis," *Surgical Infections*, vol. 17, no. 4, pp. 385–393, 2016.
- [57] S. Maier, T. Traeger, M. Entleutner et al., "Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis," *Shock*, vol. 21, no. 6, pp. 505–512, 2004.
- [58] D. G. Remick, A. Ayala, I. H. Chaudry et al., "Premise for standardized sepsis models," *Shock*, vol. 51, no. 1, pp. 4–9, 2019.
- [59] M. F. Osuchowski, A. Ayala, S. Bahrami et al., "Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis," *Shock*, vol. 50, no. 4, pp. 377–380, 2018.
- [60] J. C. Alverdy, R. Keskey, and R. Thewissen, "Can the cecal ligation and puncture model be repurposed to better inform therapy in human sepsis?," *Infection and Immunity*, vol. 88, no. 9, 2020.
- [61] A. Guillon, Translational Research Committee of the French Intensive Care Society (Société de Réanimation de Langue Française), S. Preau et al., "Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU," *Annals of Intensive Care*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [62] J.-. M. Cavaillon, M. Singer, and T. Skirecki, "Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 12, no. 4, article e10128, 2020.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

The secretome deregulations in a rat model of endotoxemic shock.

A. Blangy--Letheule^{#1}, A. Persello^{#1,2}, S. Michelland^{3,4}, V. Cunin^{3,4}, F. Souab¹, V. Aillerie¹, J. Dhot¹, J. Montnach¹, M. Seve^{3,4}, S. Bourgoïn-Voillard^{3,4,5}, B. Rozec¹, M. De Waard^{1,2,6,*}, B. Lauzier^{1,*}

¹ Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

² InFlectis BioScience, Nantes, France

³ Univ. Grenoble Alpes, LBFA and BEeSy, Inserm, U1055, PROMETHEE Proteomic Platform, Saint-Martin-D'hères, France

⁴ CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, PROMETHEE Proteomic Platform, Grenoble, France

⁵ University of Paris-Est Créteil (UPEC), Inserm U955, Equipe 21, UMR_S955, APHP, Hôpital H. Mondor-A. Chenevier, Centre d'Investigation Clinique Biothérapie, Créteil, France

⁶ LabEx Ion Channels, Science and Therapeutics, F-06560 Valbonne, France

* Codirected this work.

Participate equally to this work

This work was supported by Astrid, Agence Nationale de la Recherche, Génavie.

angelique.blangy--letheule@univ-nantes.fr ; antoine.persello@univ-nantes.fr; smichelland@chu-grenoble.fr ; vcunin@chu-grenoble.fr ; virginie.aillerie@univ-nantes.fr ; fouz500@hotmail.fr ; justine.dhot@univ-nantes.fr ; Jerome.montnach@univ-nantes.fr ; michel.seve@univ-grenoble-alpes.fr ; sandrine.bourgoin@univ-grenoble-alpes.fr ; bertrand.rozec@chu-nantes.fr ; michel.dewaard@univ-nantes.fr ; benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

Authors participation:

A. Blangy—Letheule and A. Persello contributed to data acquisition, analyses, interpretation and participated to the article writing.

S.Michelland, V.Cunin, M.Seve and S. Bourgoïn-Voillard contributed to the experiments, performed the proteomic data acquisition/analysis and participated to the writing of the manuscript

V.Aillerie, F. Souab and J. Dhot contributed to the experiments and the acquisition and interpretation of the data.

J. Montnach contributes to the analysis of proteomic data.

B. Rozec, M. De Waard, and B. Lauzier managed the project and contributed to experimental design and correcting the manuscript for intellectual content and gave final approval of the version to be submitted

Corresponding author: Benjamin Lauzier, PhD; l'institut du thorax, INSERM, 8 quai Moncousu, 44000 Nantes, France, Phone: +33 2 28 08 01 57, E-mail: benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

36 **Introduction:** Septic shock is a systemic inflammatory response syndrome associated with organ
37 failures. Earlier diagnosis would allow decreasing the mortality rate. However, there is currently a lack
38 of predictive biomarkers. The secretome is the set of proteins secreted by a cell, a tissue or an organism
39 at a given time and under certain conditions. The plasma secretome is easily accessible from biological
40 fluids and represents a good opportunity to discover new biomarkers that can be studied with non-
41 targeted "omic" strategies.

42 **Aims:** To identify relevant deregulated proteins (DEP) in the secretome of a rat endotoxemic shock
43 model.

44 **Methods:** Endotoxemic shock was induced in rats by injection of lipopolysaccharides (LPS, *S.*
45 *enterica typhi*, 0.5 mg/kg, *iv*) and compared to controls (Ringer Lactate, *iv*). Under isoflurane
46 anesthesia, carotid cannulation allowed mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR)
47 monitoring and blood sampling at different time points (T0, and 50 or 90 with EDTA and protease
48 inhibitor). Samples were prepared for a large-scale tandem mass spectrometry (MS-MS) based on a
49 label free quantification to allow identification of the proteins deregulated upon endotoxemic
50 conditions. A gene ontology (GO) analysis defined several clusters of biological processes (BP) in which
51 the DEP are involved.

52 **Results:** Ninety minutes after shock induction, the LPS group presents a reduction in MAP (-45%,
53 $p < 0.05$) and an increased lactate levels (+27.5%, $p < 0.05$) compared to the control group. Proteomic
54 analyses revealed 10 and 33 DEP in the LPS group respectively at 50 and 90 minutes after LPS injection.
55 At these time points, GO-BP showed alterations in pathways involved in oxidative stress response and
56 coagulation.

57 **Conclusion:** This study proposes an approach to identify relevant DEP in septic shock and brings new
58 insights in the understanding of the secretome adaptations upon sepsis.

59 **Key Words:** Secretome, proteomics, septic shock, LPS model, rat model

1 Introduction

Septic shock is responsible for one death every 2.8 seconds worldwide (« World Sepsis Day » 2020). In 50% of cases, septic shock causes myocardial dysfunction resulting in over 60% excess global mortality (Ferron *et al.*, 2019). The dynamics of septic shock consist of a compensation phase followed by a decompensation one. The kinetics of the different phases of the pathology vary according to the patient, resulting in a variation in the kinetics of organ dysfunctions from one patient to another. Limiting the development of cardiovascular dysfunctions and optimizing care would increase the patient's chances of survival. Septic shock is multifactorial and presents a large heterogeneity between patients. This point explains the variable kinetics of pathology development and makes it difficult to investigate causal mechanisms (Nemzek, Hugunin, et Opp 2008). The early use of sensitive and specific biomarkers of septic shock clinical evolution would facilitate rapid diagnosis and early management of patients. Such biomarkers must be easily accessible and quickly analyzable for clinical use. Unfortunately, due to the complexity of the pathology, such biomarkers are not currently available for clinicians (Teggert, Datta, et Ali 2020). The use of animal models allows investigators to considerably limit the heterogeneity between individuals, while, at the same time, improves access to samples before shock initiation and throughout the progression of the pathology. The *in vivo* administration of lipopolysaccharides (LPS), that triggers endotoxemic shock, is one of the most common and simple way to model shock in animals (Lewis, Seymour, et Rosengart 2016).

In this context, the study of the secretome, defined as the set of proteins secreted by a cell, tissue or organism at a given time and under certain condition is a relevant approach (Chenau, Michelland, and Seve 2008). Changes in plasmatic secretome composition may reflect a pathological state (Vizoso *et al.*, 2017). Indeed, injection of plasma from patients diagnosed with septic shock in a healthy mouse has been used to made the first proof of concept in 2011 that the secretome could provide information on this pathology. This approach demonstrated the presence of circulating blood factors causing the physiopathology of septic shock (van Hees *et al.*, 2011). The proteins that are deregulated in the secretome of septic shock patients could potentially be used as biomarkers of the septic shock prognosis. The objective of this study is to identify early biomarkers of septic shock by studying sepsis prior to and at the acute stage of the decompensation phase. For this purpose, the plasma secretome in a rat model of endotoxemic shock was studied at two time points using a large-scale non-targeted mass spectrometry (MS) approach. The design of this study made it possible to follow each subject before shock induction and then at two important time points of the development of the pathology. Through this approach, we identified deregulated proteins (DEP) of the acute stage of shock that is associated with the deregulation of numerous biological processes such as coagulation or the response to oxidative stress.

2 Methods:

2.1 Animals

Twelve weeks old Wistar male rats were housed under standard conditions of temperature (21-24 °C), humidity (40-60%) and a 12-hour light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. Experiments were approved by the ethics committee in charge of animal experimentation, the committee of the Pays de la Loire, (12760-2017121810244298) and were performed in accordance with the French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the National Institutes of Health (NIH).

2.2 Endotoxemic rat model

Endotoxemia was induced by intravenous injection of 0.05 mg.kg⁻¹ of purified LPS derived from *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* (batch 078M4021V, Sigma, St. Louis, USA) suspended in Ringer Lactate (RL) as previously described (Roul *et al.*, 2015). Rats were randomly distributed into four groups: The Control, having received an injection of RL, and LPS groups followed during 50 minutes (CT50 and LPS50, respectively) or during 90 minutes (CT90 and LPS90 respectively), with 6 animals per group. In each group, animals are their own control meaning that each group comprised a T0 time point and either a T50 or a T90 time point (**Figure 1**).

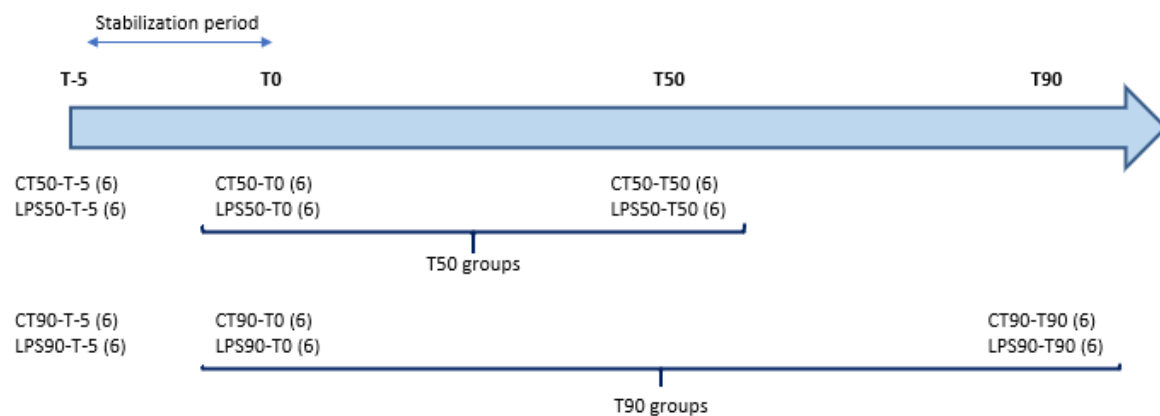


Figure 1: Group repartition for the 12-weeks-old Wistar rats
The period between T-5 and T0 corresponds to stabilization. T0 is the control before solvent or LPS injection, and therefore concerns the same rats 50 or 90 minutes after injection. Each group consists of 6 rats (6).

2.3 Monitoring

Animals were anesthetized with 2% volume of isoflurane and 0.6 L.min⁻¹ O₂ to limit hemodynamic effects of anesthesia. Arterial blood pressure measurements were performed through the left carotid artery to calculate the mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR). Briefly, the right carotid artery was isolated, ligated at the distal end and a PE-50 fluid filled catheter was inserted. Pressure signal and HR were continuously recorded, displayed and stored by the IOX[®] software (EMKA technologies, Paris, France).

2.4 Blood analyses and plasma preparation

A volume of 500 µL or 5 mL of arterial blood were respectively collected at T0 and at the terminal endpoint (50 or 90 minutes) through the carotid catheter. At T0, a filling with RL was performed to compensate for the volume collected. Blood samples were placed in 2 mL EDTA tubes (Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Germany) containing protease inhibitors (Complete ULTRA Tablet, Mini, Protease Inhibitor Cocktail, MERCK laboratory). Lactate concentration were measured from 10 µL of venous blood using Nova StatStrip (Nova Biomedical, Rungis, France). For terminal sampling, blood gases, electrolytes and metabolites (BGEM) were measured from 90 µL of arterial blood using a BGEM card (Siemens Healthcare™, Ottawa, Canada) and analyzed by the ePOC analyzer (Siemens Healthcare™, Ottawa, Canada). Plasma were obtained by blood centrifugation (10 minutes, 1,300 g) at room temperature (RT) and frozen in liquid nitrogen. Thereafter samples were stored at -80°C.

2.5 Sample preparation for label free mass spectrometry analyses

Plasmatic protein concentration was determined by colorimetry using the BCA method (BiCinchoninic acid Assay, Thermo Fisher Scientific, Walt-man, Massachusetts, United States). The absorbance was measured at 560 nm using Varioskan reader (Thermo-Fisher Scientific, Walt-man, Massachusetts, USA). Plasmatic samples were enriched for low abundance proteins using ProteoMiner™ kits (Biorad, Hercules, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The plasma volume loaded on ProteoMiner™ column contained 10 mg of total proteins per column. In order to remove salts, eluate was loaded in 2 kDa dialysis cassette (Slide-A-Lyzer, ThermoFischer Scientific, United States) in a 50 mM ammonium bicarbonate dialysis buffer (pH= 7.7 ± 0.1, batch BCBZ3540, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The concentration of proteins present in the dialysate was determined as previously described. Aliquots were finally prepared in order to obtain 25 µg of protein and stored at -80°C prior to the mass spectrometry analysis. Prior to mass spectrometry, 25 µg of proteins of each sample were reduced with Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) at 56°C for 1 h, alkylated with iodoacetamide (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 min in dark, and digested at 37°C overnight simultaneously with both trypsin and Lys-C enzymes (Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade, Promega, France) using an enzyme/protein ratio of 3:100. Each sample was spiked with 700 fmol of enolase digest from *Saccharomyces cerevisiae* (Waters, Milford, United Kingdom). Resulting peptides were desalted with C18 spin columns with a peptide binding capacity of 30 µg (Pierce C-18 Spin columns, Thermo Fisher Scientific, Walt-man, Massachusetts, United States). Two micrograms of each sample were mixed to prepare a Quality Control (QC) sample. Samples were dried by using a speed vacuum (Eppendorf) and stored at -20°C until label-free high-mass resolution/accuracy mass spectrometry analyses.

2.6 Liquid Chromatography and High-Resolution Accurate-Mass (HRAM) Mass Spectrometry analyses

Protein quantitation was performed according to a label-free quantitative proteomic approach based on a high-resolution accurate-mass (HRAM) mass spectrometry analysis. For this purpose, samples (including QC to verify the stability of the signal) were analyzed by an UHPLC-MS(HRAM) system, a Vanquish Flex Binary UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, France) coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, France) equipped with an electrospray ionization source operating in a positive mode and an Orbitrap mass analyzer. Peptides resuspended in buffer A (2% ACN, 0.1% FA) were loaded on the Vanquish UPLC equipped with a Viper Fingertight Fittings Column Protection (Viper Inline Filter, Titanium, av. Frit pre-size 0.5 μm) and a C18 column (ACCL RSLC120 C18, 2.2 μm , 120 $\text{\AA}$, 2.1 mm X 250 mm). A binary gradient of 120 min of buffer A (99.9% H_2O , 0.1% FA) and buffer B (99.9% ACN, 0.1% FA) at a flow rate of 0.4 mL/min and at 60°C set up as follows: 0–2 min, 1–3% B; 2–55 min, 3–15% B; 55–95 min, 15–38% B; 95–105 min, 38–95% B, 105–109 min, 95% B, 109–110 min, 95–1% B and 110–120 min, 1% B was applied to separate peptides. MS analyses were performed upon a full MS mode with a resolution of 70,000, a maximum IT of 17 ms within a scan range of 200–2,000 m/z and a lock-mass ion at m/z 445.120024 of polycyclodi-methylsiloxane from the ambient air. The external calibration was done with a CalMix calibrant (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Walt-man, Massachusetts, United States) in positive mode by considering ± 5 ppm of mass tolerance. MS/MS analyses were performed by using a data-dependent acquisition based on HCD (higher energy collisional dissociation) activation mode with an isolation window of 4 u, a resolution of 17,500, an automatic gain control target of 2.10^5 , a maximum IT of 200 ms on the 10 most intense ions. A dynamic exclusion of 10 s was applied. Each sample was analyzed in duplicate. The data were acquired with Thermo Scientific™ XCalibur 2017 v.4.1.31.9. software.

2.7 Data analyses

The identification of proteins was achieved thanks to PEAKS®X Studio 10.0 software (Ma *et al.*, 2003) and the UniprotKB database of *Rattus norvegicus* (UP000002494- Release 2020_01) uploaded with the enolase protein from *Saccharomyces cerevisiae* (P00924). The following criteria were applied for the protein identification: a fixed modification of carbamidomethylation, variable modifications of oxidation (HW), oxidation (M), acetylation (Protein N-term), 2 missed cleavages, at least 2 unique peptides, a tolerance MS of 5 ppm, a tolerance MS/MS of 0.01 Da, a peptide FDR of 1%, a protein $-\log P$ of 20. The identification was done by using PEAKS DE Novo, PEAKS database and SPIDER tools. The label-free protein quantitation was done by considering a retention time shift tolerance of 3 min and the enolase 1 protein from *Saccharomyces cerevisiae* (P00924) as internal standard for the signal normalization. The quantity of proteins after LPS injection was compared in

each group of six biological replicates with paired controls as detailed in the previous section. LPS and RL administration in Wistar rats allowed the study of i) changes in the secretome 50 min post-injection (group CT50-T0 vs CT50-T50 and group LPS50-T0 vs LPS50-T50) and ii) secretome adaptations 90 min LPS post-injection (group CT90-T0 vs group CT90-T90 and group LPS90-T0 vs LPS90-T90). A total of 48 samples, with technical duplicate for each of them, were therefore analyzed. The protein quantitation was performed only on proteins in which at least two peptides were quantified within a chromatography retention time range between 0 and 120 min with a score quality ≥ 6 . This approach led to the identification of 401 proteins in the T50 group and 514 proteins in the T90 group.

Proteins with missing values (indicated by the NA symbol) in at least 3 samples per group and less than 15% of coverage were withdrawn (**Figure 2**). The quantified proteins were considered deregulated only if they have a fold change higher than 2 ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$) or lower than -2 ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$) in at least 4 samples over the 6 in each group. 14 Deregulated proteins in the control groups were excluded from the study (**Figure 2**).

The clustering of the DEP was analyzed using the STRING protein database for Gene Ontology (GO) analyses. The results of the analyses include Biological process (BP) and cellular component (CC).

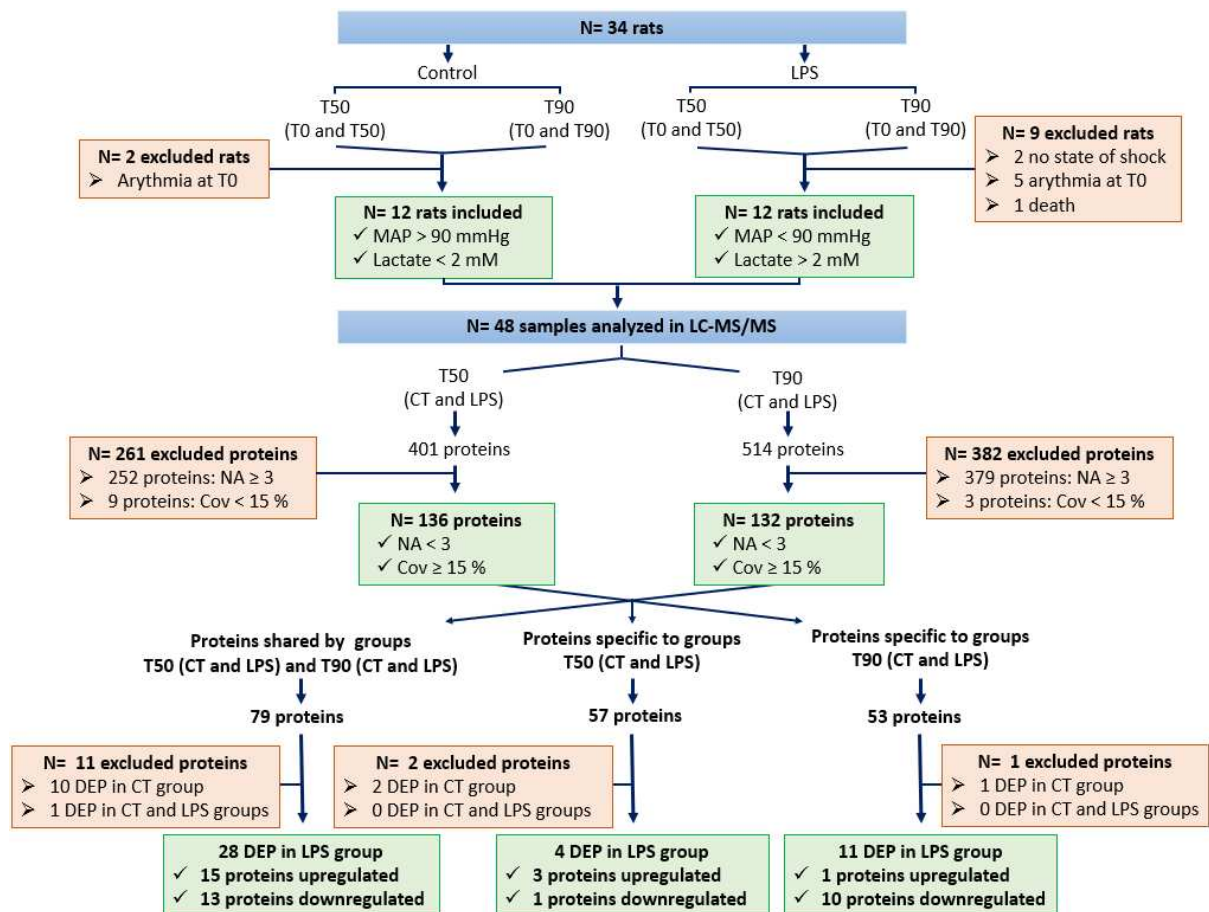


Figure 2: Flow chart of inclusion and exclusion procedure used to obtain a list of deregulated protein.

The animals were divided into 4 groups (CT50, LPS50, CT90, LPS90). Physiological parameters made it possible to include 24 rats in the study. For each rat, 2 times points were studied (T0 and T50 or T90), were analyzed by mass spectrometry (N= 48 samples) and proteomic results were analyzed by RStudio software. Proteins with a maximum of 2 missing data (NA) per sample and a coverage (Cov) greater than 15% were selected. A total of 136 proteins in group T50 and 132 proteins in group T90 were included. The deregulated proteins (DEP) present in the controls were excluded from the study.

2.8 Statistical analyses

Hemodynamic results were expressed as mean $\pm$ SEM of N different rats. For hemodynamics parameters and lactatemia, data were analyzed by a two-way ANOVA test with Bonferroni post hoc test. Creatinemia were analyzed by a Kruskal-Wallis test and were expressed as median and quartile. A value of $P < 0.05$ was considered significant. All statistical calculation and graphs (except those performed with R software) were performed using GraphPad PRISM 8 software (8.4.2 version).

2.9 Data availability

The proteomic data were deposited to the ProteomeXchange Consortium with the MassIVE identifier MSV000081840 (<http://massive.ucsd.edu>) and ProteomeXchange identifier PXD008530 (<http://www.proteomexchange.org>).

3 Results

3.1 Animal model

3.1.1 Effect of endotoxemic shock on hemodynamic parameters

Continuous hemodynamic monitoring showed no significant changes neither in HR nor in MAP during the 5 min of stabilization (from T-5 to T0). MAP and HR remained stable in the control group at 90.0 ± 10.0 mmHg and 390.0 ± 10.0 bpm during the whole procedure. Injection of LPS (T0) induce any modification in HR (400.0 ± 10.0 bpm) (**Figure 3A**) whereas it was followed by an early decrease in MAP (Ctrl: 95.6 ± 2.9 mmHg vs LPS: 80.6 ± 3.7 mmHg, $p < 0.05$, **Figure 3B**) with return to basal values after 10 min. From 50 min after LPS injection to the end of procedure, MAP decreased significantly (from 91.4 ± 3.4 mmHg at 50 min to 60.5 ± 6.9 mmHg at 90 min, $p < 0.001$, **Figure 3B**).

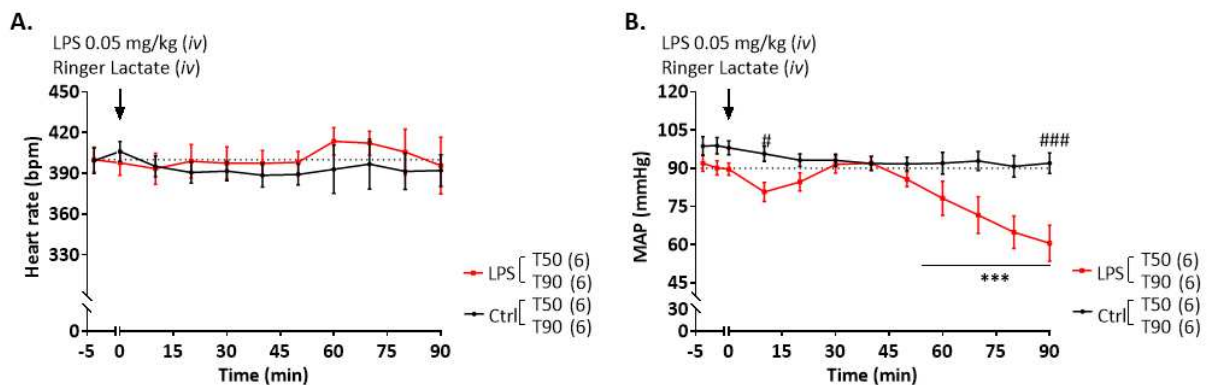


Figure 3: Effect of lipopolysaccharide (LPS) administration on heart rate (HR) and mean arterial blood pressure (MAP). Black and red squares represent the control and LPS rats respectively. The dotted line represents the threshold considered as physiological. Values represent mean $\pm$ SEM of 6 rats per groups. A. Heart rate and B. MAP were evaluated during 50 or 90 min after LPS injection and were expressed in beats per min (bpm) and mmHg, respectively. The symbol # represents a comparison at a given time between CT and LPS groups and the symbol * represents a comparison over time for LPS group. # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ two-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test.

3.1.2 Effect of endotoxemic shock on plasmatic biomarkers

Arterial creatinine and venous lactate concentrations were measured in Ctrl and LPS groups at T50 and T90 and T0, T50 and T90 respectively (**Figure 4**). No change in creatininemia was observed at T50 between Ctrl and LPS groups. However, creatininemia in LPS T90 groups increase significantly when compared to time-matched Ctrl (Ctrl T90: 0.26 ± 0.04 mg/dL; LPS T90: 1.07 ± 0.16 mg/dL, $p < 0.01$, **Figure 4A**) indicating an alteration in renal function. Lactatemia remained normal in Ctrl throughout the protocol while significantly increasing in the LPS T90 group (LPS T0: 1.02 ± 0.09 mmol/L vs LPS T90: 3.04 ± 0.90 mmol/L, $p < 0.001$; LPS T50: 1.63 ± 0.10 mmol/L vs LPS T90: 3.04 ± 0.90 mmol/L, $p < 0.05$; Ctrl T90: 0.82 ± 0.17 mmol/L vs LPS T90: 3.04 ± 0.90 mmol/L, $p < 0.001$, **Figure 4B**). These results reflect a compensated state 50 min after LPS administration, followed by the onset of hypotension, which is probably a cause of the hypoperfusion and tissue distress detected during the decompensation phase at 90 min after LPS administration.

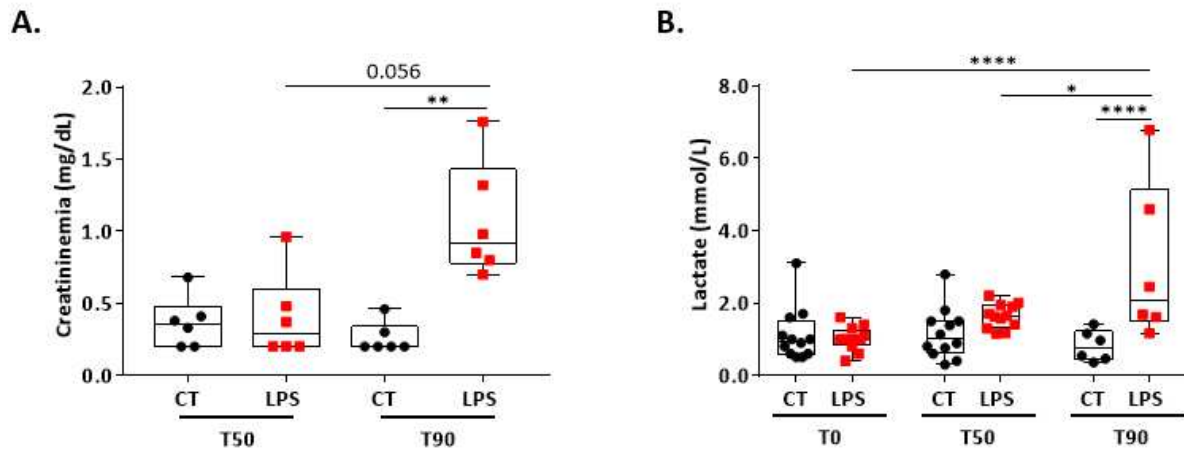


Figure 4: Variation of creatinemia (mg/dL) and lactatemia (mmol/L) throughout development of endotoxemic shock. Black circles and red squares represent the control and LPS rats, respectively. A. Arterial creatinine was measured at 50 or 90 minutes after shock induction B. Venous lactates was measured at 0 and 50 or 90 min. Box & Whiskers represent measures. Panel A. and B. were analyzed with Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; **** $p < 0.001$ and two-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test ** $p < 0.01$.

3.2 Identification of deregulated proteins in the secretome during sepsis

Over the 48 samples included in the study, a total of 401 and 514 proteins were quantified by LC-MS/MS analysis in the T50 (CT and LPS) and T90 group (CT and LPS), respectively. (Figure 2). Proteins selection with missing data (NA) and a protein coverage filters led to the identification of 136 proteins at T50 and 132 proteins at T90 (Figure 2). DEP in controls groups (14) were excluded from this study. Three levels of analysis were then performed (1) the study of proteins identified in LPS samples, both in T50 and T90 groups, (2) the study of proteins identified only in T50 group and (3) the study of proteins identified only in T90 group (Figure 2).

3.2.1 Study of the evolution of the level of proteins identified in the T50 and T90 groups.

Seventy-nine proteins were found to be common in the T50 and T90 groups (CT and LPS) (Figure 2 and Table S2). The study of levels of these proteins over time showed a variation in their expression profile between the CT and LPS groups (Figure S1-2).

Table 1 : Deregulated proteins found to be common at 50 and 90 min after induction of endotoxemic shock.

Uniprot accession number	Protein	Gene name	Protein reference described	Log ₂ FC Median (min ; max)	n/6
LPS T50					
P06765	Platelet factor 4 *	<i>Pf4</i>	(Tang <i>et al.</i> , 2010)	3.31 (1.02 ; 5.20)	5/6
D3ZFH5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	<i>Itih2</i>	-	1.25 (1.08 ; 2.34)	4/6
P26644	Beta-2-glycoprotein 1 *	<i>ApoH</i>	(Schrijver <i>et al.</i> , 2020)	1.45 (1.03 ; 1.55)	
O55004	Ribonuclease 4	<i>RNase 4</i>	-	1.78 (1.70 ; 2.90)	
P00697	Lysozyme C-1 *	<i>Lyz1</i>	(Gotes <i>et al.</i> , 2014)	1.77 (1.70 ; 2.63)	
P23764	Glutathione peroxidase 3 *	<i>Gpx3</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2019)	-2.58 (-1.45 ; -4.75)	4/6
LPS T90					
P17475	Alpha-1-antiproteinase *	<i>Serpina1</i>	(Blaurock-Möller <i>et al.</i> , 2019)	3.73 (2.97 ; 5.65)	5/6
Q99PS8	Histidine-rich glycoprotein *	<i>Hrg</i>	(Wake <i>et al.</i> , 2020)	2.39 (1.37 ; 3.89)	
D3ZFH5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	<i>Itih2</i>	-	1.92 (1.58 ; 3.82)	4/6
Q9QUH3	Apolipoprotein A-V *	<i>Apoa5</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2020)	1.44 (1.00 ; 2.24)	
P24594	Insulin-like growth factor-binding protein 5	<i>Igfbp5</i>	-	2.14 (1.02 ; 3.79)	
P08650	Complement C5 *	<i>C5</i>	-	5.27 (3.28 ; 6.21)	
O55004	Ribonuclease 4	<i>Rnase4</i>	-	1.68 (1.28 ; 2.32)	
D3ZTE0	Coagulation factor XII *	<i>F12</i>	(Mavrommatis <i>et al.</i> , 2000)	1.42 (1.32 ; 1.73)	
P00697	Lysozyme C-1 *	<i>Lyz2</i>	(Gotes <i>et al.</i> , 2014)	2.86 (1.25 ; 3.81)	
Q6IRK9	Carboxypeptidase Q	<i>Cpq</i>	-	1.94 (1.05 ; 3.34)	5/6
P04638	Apolipoprotein A-II *	<i>Apoa2</i>	(Khovidhunkit <i>et al.</i> , 2004)	-1.96 (-1.19 ; -5.20)	
P55797	Apolipoprotein C-IV	<i>Apoc4</i>	-	-1.88 (-1.37 ; -2.91)	
P20767	Ig lambda-2 chain C region	<i>N/A</i>	-	2.39 (-1.50 ; -3.30)	
Q8R2H5	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D *	<i>Gpld1</i>	(Rhode <i>et al.</i> , 1999)	-1.48 (-1.02 ; -2.72)	
P14630	Apolipoprotein M *	<i>Apom</i>	(Kumaraswamy <i>et al.</i> , 2012)	-2.94 (-1.46 ; -4.82)	
P23764	Glutathione peroxidase 3 *	<i>Gpx3</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2019)	-2.05 (-1.48 ; -3.44)	
Q68FP1	Gelsolin *	<i>Gsn</i>	(Horváth-Szalai <i>et al.</i> , 2018)	-2.05 (-1.67 ; -4.47)	4/6
P06759	Apolipoprotein C-III	<i>Apoc3</i>	-	-2.60 (-1.08 ; -3.66)	
P55159	Serum paraoxonase/arylesterase 1 *	<i>Pon1</i>	(Bednars-Misa <i>et al.</i> , 2019)	-2.15 (-1.17 ; -2.49)	
P02651	Apolipoprotein A-IV	<i>Apoa4</i>	-	-1.54 (-1.04 ; -2.61)	
P35859	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	<i>Igfals</i>	-	-2.49 (-2.20 ; -2.90)	
P10960	Prosaposin *	<i>Psap</i>	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 2018)	-2.57 (-1.53 ; -3.90)	

Proteins with a log₂Foldchange (Log₂FC) greater than 1 were highlighted in yellow and proteins with a Log₂FC less than -1 were highlighted in blue. N represent the number of rats in which the protein has been found to be deregulated over the 6 rats. Proteins with a green star have already been described by other reports in the context of sepsis and septic shock.

Among these 79 proteins, to analyze common or deregulated proteins, T50 or T90 were compared to their T0. Among the LPS groups, 15 proteins were up-regulated (5 proteins at T50 groups and 10 proteins at T90). Finally, 13 proteins were found down-regulated: 1 at T50 and 12 at T90 (**Table I**).

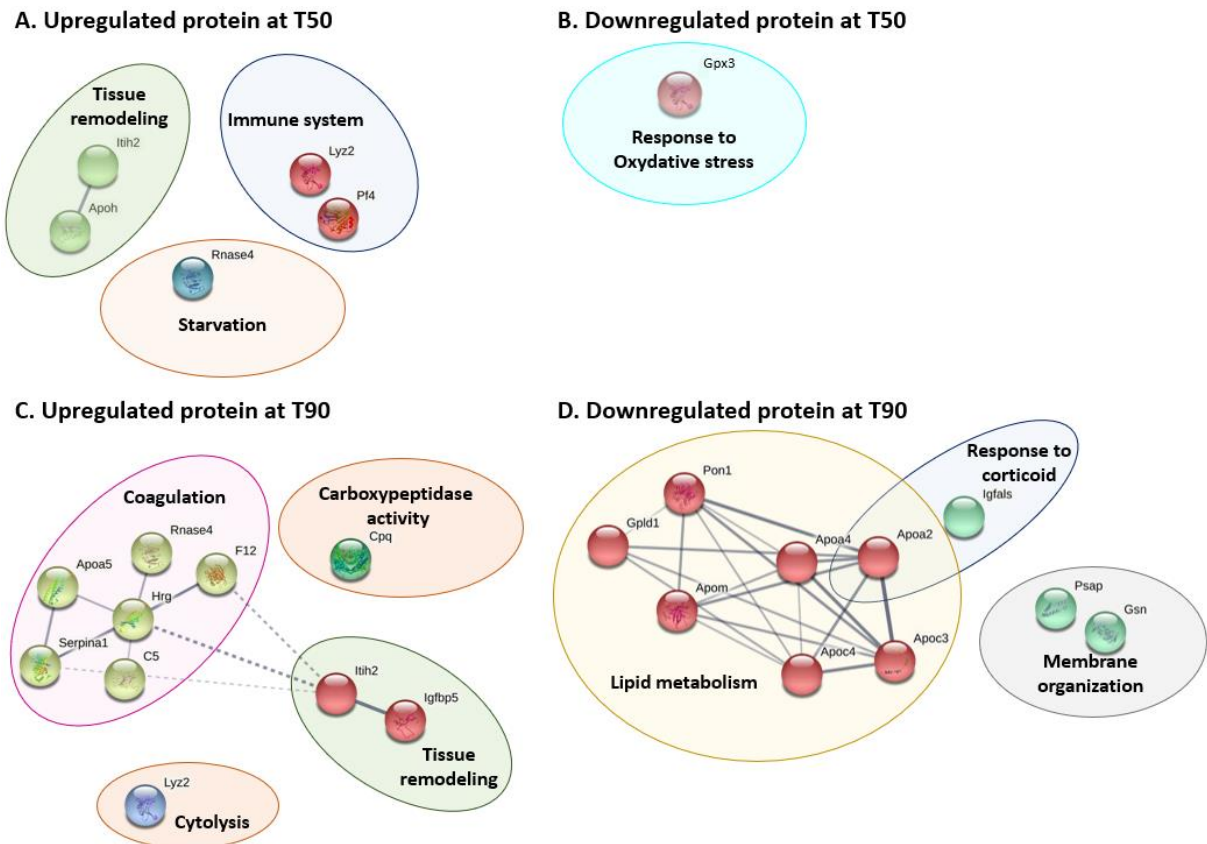


Figure 5: Protein-protein interaction network of **A)** Up and **B)** Down-regulated proteins in the LPS T50 group and **C)** Up and **D)** Down-regulated proteins in the LPS T90 groups. The study of proteins identified both in T50 (CT and LPS) and T90 (CT and LPS). The analyses using Gene Ontology (GO) databases revealed the most modified biological processes following the injection of LPS. STRING protein database was used to clustered deregulated proteins. The continuous lines represent protein interactions within the cluster and the discontinuous lines represent protein interactions between different clusters.

The analyses of Gene Ontologies highlighted functional annotations of the selected proteins. The analyses of the GO cellular component (CC) showed that the proteins identified are plasma proteins (**Table S1**). Fifty minutes after LPS administration, up-regulated proteins belong to tissue remodeling, immune system and starvation (**Figure 5A**) whereas down-regulated ones belong to response to oxidative stress (**Figure 5B**). Ninety minutes after LPS administration, up-regulated proteins belong to carboxypeptidase activity, cytolysis, tissue remodeling and coagulation (**Figure 5C**). whereas down-regulated ones belong to lipid metabolism, membrane organization and response to corticoid (**Figure 5D**).

3.2.2 Identification of proteins specific to the T50 groups

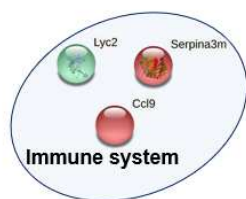
Analyses of the proteins specific to T50 (CT and LPS) identified 57 proteins that are present at T50 but not at T90 (**Figure 2 and Table S3**). The study of protein expression over time revealed a variation in the protein profile between the control and LPS groups (**Figure S3**). Among the 57 proteins identified, 3 are up-regulated and 1 protein is down-regulated 50 minutes after LPS administration (**Table II**). Both up-regulated or down-regulated proteins specific to T50 group are implicated in immune response (**Figure 6**).

Table II: Deregulated proteins at 50 min after induction of endotoxemic shock.

Uniprot Accession number	Protein	Gene name	Protein reference described	Log ₂ FC (Range)	n/6
Q5FVN3	Ccl9-like protein *	<i>Ccl9</i>	(Núñez <i>et al.</i> , 2010)	3.69 (1.38 ; 4.98)	4/6
Q05820	Putative lysozyme C-2	<i>Lyz2</i>	-	1.67 (1.30 ; 2.64)	
Q63556	Serine protease inhibitor A3M	<i>Serpina3m</i>	-	1.10 (1.30 ; 2.63)	
Q5BK77	Chemerin *	<i>Rarres2</i>	(Horn <i>et al.</i> , 2016)	-2.24 (-1.36 ; -2.98)	5/6

Proteins with a log₂Foldchange (Log₂FC) greater than 1 were highlighted in yellow and proteins with a Log₂FC less than -1 were highlighted in blue. N represent the number of rats in which the protein has been found to be deregulated over the 6 rats. Proteins with a green star have already been described in the context of sepsis and septic shock.

A. Upregulated protein at T50



B. Downregulated protein at T50

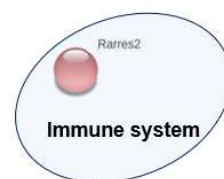


Figure 6: The network of A) upregulated proteins and B) downregulated protein in the LPS T50 specific group.

The study of proteins identified in T50 (CT and LPS) and not in T90 (CT and LPS). The analyses using Gene Ontology (GO) databases reveal the most modified biological processes (BP) following the injection of LPS. STRING protein database was used to clustered deregulated proteins.

3.2.3 Identification of proteins specific to the T90 groups

Analyses of the proteins specific to T90 (CT and LPS) identified 53 proteins that are present at T90 but not at T50 (**Figure 2 and Table S4**). The study of protein expression over time revealed a variation in the protein expression profile between the control and LPS groups (**Figure S4**). Among the 53 proteins identified, 11 proteins were found to be specifically deregulated in the LPS group between T0 and T90. Among the deregulated proteins in the LPS group, 1 protein is up-regulated and 10 are down-regulated (**Table III**).

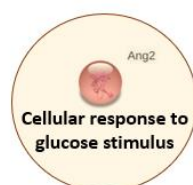
Table III: Mass spectrometry analyses reveal deregulated proteins at 90 min after induction of endotoxemic shock.

Uniprot Accession number	Protein	Gene name	Protein reference described	Log ₂ FC (Range)	n/6
Q5GAM5	Angiogenin ribonuclease 2	<i>Ang2</i>	-	1.79 (1.32 ; 3.47)	4/6
Q6MG90	C4a anaphylatoxin	<i>C4a</i>	-	-3.22 (-1.42 ; -6.85)	6/6
D3ZQ25	Fibulin-1	<i>Fbln1</i>	-	-2.37 (1.24 ; 5.70)	
Q5M890	Apolipoprotein N	<i>Apon</i>	-	-4.55 (-1.46 ; -5.61)	
Q5M8C3	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4	<i>Serpina4</i>	-	-1.59 (-1.11 ; -2.75)	
Q64240	Protein AMBP *	<i>Ambp</i>	(Ramadan <i>et al.</i> , 2020)	-3.25(-1.09 ; -5.11)	
B1H260	Coagulation factor XIII B chain	<i>F13b</i>	-	-3.86 (-1.07 ; -5.12)	5/6
F1LZ11	Ig-like domain-containing protein	N/A	-	-1.72 (-1.00 ; -3.56)	4/6
A0A0G2JXI1	Coagulation factor V *	<i>F5</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2014)	-2.23 (-1.76 ; -4.25)	
P08649	Complement C4 *	<i>C4</i>	(Lendak <i>et al.</i> , 2018)	-3.14 (-1.16 ; -4.59)	
P07151	Beta-2-microglobulin *	<i>B2m</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2018)	-1.51 (-1.32 ; -2.36)	

Proteins with a log₂Foldchange (Log₂FC) greater than 1 were highlighted in yellow and proteins with a Log₂FC less than -1 were highlighted in blue. N represent the number of rats in which the protein has been found to be deregulated over the 6 rats. Proteins with a green star have already been described in the context of sepsis and septic shock.

Up-regulated proteins specific to T90 group are implicated in glucose metabolism whereas down-regulated ones are implicated in lipid metabolism, negative regulation of endopeptidase activity and coagulation (**Figure 7**).

A. Upregulated protein at T90



B. Downregulated protein at T90

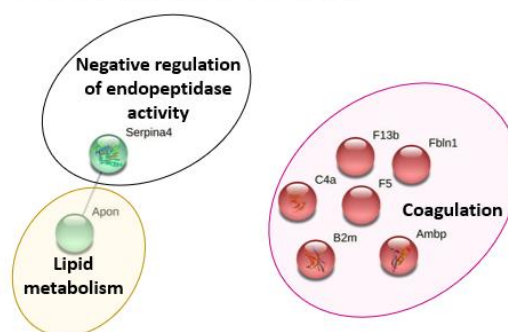


Figure 7: The network of A) up-regulated and B) Down-regulated proteins in the LPS T90 specific group. The analysis using Gene Ontology (GO) databases revealed the most modified biological processes (BP) following the injection of LPS. STRING protein database was used to clustered deregulated proteins. The continuous line represent protein interactions within the cluster.

4 Discussion

Our study aims to identify the secretome adaptations of a rat model of septic shock. For this purpose, a proteomic analysis was performed in the secretome of control rats and rats in endotoxemic shock 50 (T50) or 90 (T90) minutes after LPS administration. Thus, this study integrates the notion of pathology evolution at 2 time points. The T50 point represents a compensated system whereas the T90 point represents an acute phase of decompensation. Three levels of analysis have been carried out. First, the study of proteins identified in both T50 and T90 groups (CT and LPS), next the study of proteins only identified in T50 group (CT and LPS) and finally the study of proteins only identified in T90 group (CT and LPS). All these studies demonstrate the deregulation of plasma levels of 11 proteins at 50 min and 33 proteins at 90 min after LPS administration.

4.1 Model of endotoxemic shock

In this study, we compared, at 2 different times, the evolution of protein expression during the progression of septic shock. For this, a rat model of endotoxemic shock, previously described, was chosen (Ferron *et al.*, 2019). The endotoxemic shock model was preferred because the use of LPS allows a better control of the kinetic of the development of pathology. In this way, the sampling should lead to more homogeneous inter-individual results. In this study, 90 min after the injection of LPS, the animals developed a clinical picture similar to sepsis with systemic arterial hypotension leading to an increase in plasma creatinine and lactate, which characterize organ dysfunction and altered metabolism (Gattinoni *et al.*, 2019). These results show that this model of early endotoxemic shock reproduces several characteristics of septic shock. However, interestingly, the heart rate did not change after the injection of LPS. This could be explained by the strain of LPS used. Nevertheless, according to the definition of Singer and collaborators, animals can be considered in septic shock (Singer *et al.*, 2016 ; Brognara *et al.*, 2019). The secretome of rats developing such a shock was studied by proteomic analysis based on non-targeted mass spectrometry. Analyses of the GOs of the plasma secretome showed that the state of shock leads to an alteration of several biological processes.

4.2 Proteomic analyses of the secretome

4.2.1 Altered protein expression at T50

Fifty minutes after shock induction, DEP were identified while the physiological parameters show any signs of tissue suffering or hypoperfusion. At this time, affected biological processes, are associated with the immune system, starvation and response to oxidative stress. Our study, using an early model of septic shock, demonstrate a decrease in plasmatic expression of glutathione peroxidase 3 (GSHPx-3), which is an enzymatic marker of oxidative stress, and an increase in histidine rich glycoprotein (HRG), which is involved in a non-enzymatic antioxidant defense mechanism (Lee *et al.*, 2019 ; Wake *et*

al., 2020). Many studies support the major role of the reactive oxygen species (ROS) in the pathogenesis of sepsis and in particular its contribution to the progression towards multiple organ dysfunction (Molina *et al.*, 2016). HRG seems particularly interesting because its plasma concentration increases early in our model. Interestingly, hepatic and plasmatic expressions of HRG have been correlated (Kuroda *et al.*, 2018) and decrease of expression lead to an increase in the basal activity of ROS-producing neutrophils, promoting the development of multiform failure (Wake *et al.*, 2016). Based on these results, HRG appears to be fundamental for septic shock pathogenesis, and could therefore be a potential biomarker of the pathology. Work of Kuroda and collaborators as well as Wake and collaborators investigate a later model of sepsis than the model used in this study which is placed in the context of an early model of sepsis. This difference in kinetics could explain the difference in plasma HRP dynamics in these different models. To validate HRG as a potential biomarker, it would be interesting to monitor plasma levels of HRG over time in order to verify its increase in plasma levels in the early phase and then its decrease in the later phase of septic shock. If this hypothesis is verified, increased HRG could be an early biomarker of sepsis. In this case, it would be interesting to study the role of this protein as a therapeutic target.

4.2.2 Altered protein expression at T90

Ninety minutes after shock induction, this study identifies deregulated proteins involved in biological processes associated with coagulation and lipid metabolism. This study demonstrated the deregulation of apolipoproteins (Apo) expression which is related to the metabolism of high-density lipoproteins (HDL). In this study, analyses of the secretome in the LPS group at 90 minutes show a decrease in Apo N, Apo A-II, Apo M, Apo C-III, Apo C-IV and Apo A-II and an increase in Apo AV. As shown previously, among these proteins, some are not yet described, such as Apo C-III and Apo C-IV, while others have already been identified in sepsis. These data reinforce the interest of our study. Khovidhunkit and colleagues, described a decrease in hepatic mRNA levels of Apo A-II and an increase in Apo A-V mRNA 8 hours after endotoxin injection. These changes in hepatic mRNA levels lead to a decrease of Apo A-II and an increase of Apo A-V in HDL particles (Khovidhunkit *et al.*, 2004). Interestingly, a recent study suggests, in septic pediatric patients, the prognostic value of Apo A-V based on an observation of increase in Apo A-V levels in the serum at the admission and a decrease in patients who did not survive. Moreover they highlighted a significant association between low levels of Apo A-V and sepsis-induced acute kidney injuries (Wang *et al.*, 2020). These results and those provided in this study suggest that Apo A-V could be a biomarker of septic shock. On the other hand, although studies have shown that Apo A-II is an important predictor of cardiovascular disease risk, its role in lipid metabolism is less clear and requires further research (Nedelkov 2017). Interestingly, Apo A-II and Apo M have been described

as being decreased in patients developing severe forms of COVID-19 which may be at the origin of septic shock (Shen *et al.*, 2020).

4.3 Limitations of the study

The use of an endotoxemic rat model to mimic septic shock raise concern regarding the extrapolation to human. A rat model based on LPS injection does not reflect exactly the complexity of human pathophysiological responses. However, it is currently the only model to follow sepsis kinetic over time in a reproducible manner. A second limitation of this study is based on the study of the plasma secretome, which requires the use of selective depletion techniques. The plasma secretome is made up of a vast dynamic range of compound concentrations. This makes particularly difficult analysis of proteins of low abundance and by hinders thus the identification of biomarkers using mass spectrometry. A selective depletion technique, called ProteoMiner®, was used in this study to detect the low abundance protein signal in a complex protein sample by reducing the dynamic concentration range of the proteins. Although necessary, this approach may remove low abundance or low molecular weight proteins because of a weak or rare interaction between the sample proteins and the hexapeptides in this ProteoMiner®.

5 Conclusion

This preliminary study found several deregulated proteins at 50 and 90 minutes after LPS injection. Gene Ontology study showed that the expression of proteins associated with the response to oxidative stress, the immune system, the coagulation or the lipid metabolism are particularly deregulated during the development of sepsis. Other studies have also reported the deregulation of these different biological processes, which reinforces the results of our work. However, this study has identified proteins, such as Apo A-II or Apo C-IV, which were not described previously in sepsis phenotype. Subsequently, the proteins identified as being deregulated in this study will have to be (i) validated by the use of more complex models for a better recapitulation of what happens at the clinical level, and (ii) tested on cellular models in order to understand the role they could play in the pathophysiology of shock.

6 Acknowledgments

We thank Dr A. LeGouellec and the Platform group of GExiM - University Grenoble Alpes for the access to Q-Exactive Plus (ThermoFisher) Mass Spectrometer supported by IDEX and Auvergne Rhone Alpes Grants. We thank the IBISA core facility Therassay for its assistance and their technical support. We thank the Experimental Therapeutic Unit (UTE) of IRS-UN for its assistance and technical support. We want to thank the Région Pays de la Loire and the European FEDER for their financial support to M. De

Waard. This work was supported by an Agence Nationale de la Recherche Grant to the LabEx Ion Channels, Science and Therapeutics (ANR-11-LABX-0015). The postdoctoral fellowship of J. Montnach is provided by the ANR-15-CE14-0004-02 grant. ANR heroism, association Sauve ton Coeur.

7 Bibliography

- Bednarz-Misa, Iwona, Magdalena Mierzchala-Pasierb, Patrycja Lesnik, Sylwia Placzowska, Krzysztof Kedzior, Andrzej Gamian, et Malgorzata Krzystek-Korpacka. 2019. « Cardiovascular Insufficiency, Abdominal Sepsis, and Patients' Age Are Associated with Decreased Paraoxonase-1 (PON1) Activity in Critically Ill Patients with Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) ». *Disease Markers* 2019 (February). <https://doi.org/10.1155/2019/1314623>.
- Blaurock-Möller, Nancy, Marko Gröger, Fatina Siwczak, Julia Dinger, Diana Schmerler, Alexander S. Mosig, et Michael Kiehntopf. 2019. « CAAP48, a New Sepsis Biomarker, Induces Hepatic Dysfunction in an in vitro Liver-on-Chip Model ». *Frontiers in Immunology* 10 (February). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00273>.
- Brognara, Fernanda, Jaci Airtton Castania, Daniel Penteado Martins Dias, Alexandre Kanashiro, et Helio Cesar Salgado. 2019. « Time Course of Hemodynamic Responses to Different Doses of Lipopolysaccharide in Unanesthetized Male Rats ». *Frontiers in Physiology* 10 (June). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00771>.
- Chenau, J., S. Michelland, et M. Seve. 2008. « Le sécrétome : définitions et intérêt biomédical ». *La Revue de Médecine Interne* 29 (7): 606-8. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2007.12.011>.
- CoMO. 2019. « World Sepsis Day - Why Every Second Counts ». CoMO. 13 September 2019. <https://www.comomeningitis.org/post/world-sepsis-day-why-every-second-counts>.
- Ferron, Marine, Julien Cadiet, Antoine Persello, Valentine Prat, Manon Denis, Angélique Erraud, Virginie Aillerie, et al. 2019. « O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock ». *Scientific Reports* 9 (December). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55381-7>.
- Gao, Rong, Guomin Li, Runhua Yang, Hongmei Yuan, et Shaogang Zhang. 2018. « Hippocampal β 2-microglobulin mediates sepsis-induced cognitive impairment ». *Molecular Medicine Reports* 17 (6): 7813-20. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8858>.
- Gattinoni, Luciano, Francesco Vasques, Luigi Camporota, Jennifer Meessen, Federica Romitti, Iacopo Pasticci, Eleonora Duscio, et al. 2019. « Understanding Lactatemia in Human Sepsis. Potential Impact for Early Management ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 200 (5): 582-89. <https://doi.org/10.1164/rccm.201812-2342OC>.
- Gotes, Jose, Krika Kasian, Hans Jacobs, Zhao-Qin Cheng, et Steven Mink. 2014. « Lysozyme, a Mediator of Sepsis That Deposits in the Systemic Vasculature and Kidney as a Possible Mechanism of Acute Organ Dysfunction ». *Shock* 41 (3): 256-65. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000095>.
- Hees, Hieronymus WH van, Willem-Jan M Schellekens, Marianne Linkels, Floris Leenders, Jan Zoll, Rogier Donders, PN Richard Dekhuijzen, Johannes G van der Hoeven, et Leo MA Heunks. 2011. « Plasma from Septic Shock Patients Induces Loss of Muscle Protein ». *Critical Care* 15 (5): R233. <https://doi.org/10.1186/cc10475>.
- Horn, Paul, Uta Barbara Metzing, Ricardo Steidl, Bernd Romeike, Falk Rauchfuß, Christoph Sponholz, Daniel Thomas-Rüddel, et al. 2016. « Chemerin in peritoneal sepsis and its associations with glucose metabolism and prognosis: a translational cross-sectional study ». *Critical Care* 20. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1209-5>.
- Horváth-Szalai, Zoltán, Péter Kustán, Balázs Szirmay, Ágnes Lakatos, Per Hjort Christensen, Tamás Huber, Beáta Bugyi, et al. 2018. « Predictive Value of Serum Gelsolin and Gc Globulin in

- Sepsis - a Pilot Study ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 56 (8): 1373-82.
<https://doi.org/10.1515/ccm-2017-0782>.
- Khovidhunkit, Weerapan, Philippe N Duchateau, Katalin F Medzihradsky, Arthur H Moser, Josefina Naya-Vigne, Judy K Shigenaga, John P Kane, Carl Grunfeld, et Kenneth R Feingold. 2004. « Apolipoproteins A-IV and A-V Are Acute-Phase Proteins in Mouse HDL ». *Atherosclerosis* 176 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.018>.
- Kumaraswamy, Sunil B, Adam Linder, Per Åkesson, et Björn Dahlbäck. 2012. « Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes ». *Critical Care* 16 (2): R60. <https://doi.org/10.1186/cc11305>.
- Kuroda, Kosuke, Hidenori Wake, Shuji Mori, Shiro Hinotsu, Masahiro Nishibori, et Hiroshi Morimatsu. 2018. « Decrease in Histidine-Rich Glycoprotein as a Novel Biomarker to Predict Sepsis Among Systemic Inflammatory Response Syndrome ». *Critical Care Medicine* 46 (4): 570–576. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002947>.
- Lee, Wei-Ju, Yen-Ling Chen, Yi-Wen Chu, et Du-Shieng Chien. 2019. « Comparison of Glutathione Peroxidase-3 Protein Expression and Enzyme Bioactivity in Normal Subjects and Patients with Sepsis ». *Clinica Chimica Acta* 489 (February): 177-82. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.10.031>.
- Lendak, Dajana, Dunja Mihajlovic, Gorana Mitic, Milan Ubavic, Aleksandra Novakov-Mikic, Jasmina Boban, et Snežana Brkic. 2018. « Complement Component Consumption in Sepsis Correlates Better with Hemostatic System Parameters than with Inflammatory Biomarkers ». *Thrombosis Research* 170 (October): 126-32. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.08.013>.
- Lewis, Anthony J., Christopher W. Seymour, et Matthew R. Rosengart. 2016. « Current Murine Models of Sepsis ». *Surgical Infections* 17 (4): 385-93. <https://doi.org/10.1089/sur.2016.021>.
- Ma, Bin, Kaizhong Zhang, Christopher Hendrie, Chengzhi Liang, Ming Li, Amanda Doherty-Kirby, et Gilles Lajoie. 2003. « PEAKS: Powerful Software for Peptide de Novo Sequencing by Tandem Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 17 (20): 2337-42. <https://doi.org/10.1002/rcm.1196>.
- Mavrommatis, Antonis, Thodoris Theodoridis, Androula Orfanidou, Charis Roussos, Vana Christopoulou-Kokkinou, et Spyros Zakynthinos. 2000. « Coagulation System and Platelets Are Fully Activated in Uncomplicated Sepsis ». *Critical Care Medicine* 28 (2): 451-57.
- Molina, Víctor, Bettina von Dessauer, Ramón Rodrigo, et Cristian Carvajal. 2016. « Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis: a prospective observational pilot study ». *Redox Report : Communications in Free Radical Research* 22 (6): 330-37. <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1239866>.
- Nedelkov, Dobrin. 2017. « Mass Spectrometric Studies of Apolipoprotein Proteoforms and Their Role in Lipid Metabolism and Type 2 Diabetes ». *Proteomes* 5 (4). <https://doi.org/10.3390/proteomes5040027>.
- Nemzek, Jean A, Kelly MS Hugunin, et Mark R Opp. 2008. « Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being ». *Comparative Medicine* 58 (2): 120-28.
- Núñez, Vanessa, Daniel Alameda, Daniel Rico, Rubén Mota, Pilar Gonzalo, Marta Cedenilla, Thierry Fischer, et al. 2010. « Retinoid X receptor α controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23): 10626-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913545107>.
- Ramadan, Sherif, Tianlu Li, Weizhun Yang, Jicheng Zhang, Zahra Rashidijahanabad, Zibin Tan, Narayanan Parameswaran, et Xuefei Huang. 2020. « Chemical Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Bikunin Associated Chondroitin Sulfate 24-mer ». *ACS Central Science* 6 (6): 913-20. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01199>.
- Rhode, Heidrun, Eric Lopatta, Margarete Schulze, Carlos Pascual, Hans-Peter Schulze, Klaus Schubert, Harald Schubert, Konrad Reinhart, et Anton Horn. 1999. « Glycosylphosphatidylinositol-

- Specific Phospholipase D in Blood Serum:: Is the Liver the Only Source of the Enzyme? » *Clinica Chimica Acta* 281 (1): 127-45. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00218-6).
- Roul, D., B. Rozec, G. André, N. Merlet, T. Tran Quang, B. Lauzier, M. Ferron, et al. 2015. « Increased B2-Adrenergic Vasorelaxation at the Early Phase of Endotoxemic Shock in Rats ». *Vascular Pharmacology* 72 (September): 181-89. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.04.007>.
- Schrijver, Irene T., Hans Kemperman, Mark Roest, Jozef Kesecioglu, et Dylan W. de Lange. 2020. « Beta-2-glycoprotein I as a biomarker for sepsis in critically ill patients in the intensive care unit: a prospective cohort study ». *Critical Care* 24 (June). <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03066-3>.
- « Sepsis ». s. d. Global Sepsis Alliance. Accessed November 10, 2020. <https://www.global-sepsis-alliance.org/sepsis>.
- Shen, Bo, Xiao Yi, Yaoting Sun, Xiaojie Bi, Juping Du, Chao Zhang, Sheng Quan, et al. 2020. « Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera ». *Cell* 182 (1): 59-72.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032>.
- Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, et al. 2016. « The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ». *JAMA* 315 (8): 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- Tang, Jing, Yijuan Sun, William Ka Kei Wu, Tianyu Zhong, Yawei Liu, Jinfang Xiao, Tao Tao, Zhenlong Zhao, et Miaoning Gu. 2010. « Propofol Lowers Serum PF4 Level and Partially Corrects Hypercoagulopathy in Endotoxemic Rats ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (9): 1895-1901. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.018>.
- Teggett, Andrew, Harish Datta, et Zulfiquir Ali. 2020. « Biomarkers for Point-of-Care Diagnosis of Sepsis ». *Micromachines* 11 (3): 286. <https://doi.org/10.3390/mi11030286>.
- Vizoso, Francisco J., Noemi Eiro, Sandra Cid, Jose Schneider, et Roman Perez-Fernandez. 2017. « Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>.
- Wake, Hidenori, Shuji Mori, Keyue Liu, Yuta Morioka, Kiyoshi Teshigawara, Masakiyo Sakaguchi, Kosuke Kuroda, et al. 2016. « Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation ». *EBioMedicine* 9 (June): 180-94. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.003>.
- Wake, Hidenori, Yohei Takahashi, Yukinori Yoshii, Shangze Gao, Shuji Mori, Dengli Wang, Kiyoshi Teshigawara, et Masahiro Nishibori. 2020. « Histidine-Rich Glycoprotein Possesses Antioxidant Activity through Self-Oxidation and Inhibition of Hydroxyl Radical Production via Chelating Divalent Metal Ions in Fenton's Reaction ». *Free Radical Research*, october, 1-13. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1825703>.
- Wang, Chunxia, Yun Cui, Huijie Miao, Xi Xiong, Jiaying Dou, Lujing Shao, Xiaomeng Tang, et Yucai Zhang. 2020. « Apolipoprotein A-V Is a Novel Diagnostic and Prognostic Predictor in Pediatric Patients with Sepsis: A Prospective Pilot Study in PICU ». *Mediators of Inflammation* 2020 (January): 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/8052954>.
- Wang, Yongzhi, Oscar Ö Braun, Su Zhang, Lingtao Luo, Eva Norström, et Henrik Thorlacius. 2014. « Dynamic Changes in Thrombin Generation in Abdominal Sepsis in Mice ». *Shock* 42 (4): 343-349. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000215>.
- Yamaguchi, Junko, Midori Nagase, Yorihiro Yamamoto, Atsushi Sakurai, Airi Kubo, Hikaru Mitsuhashi, Masaru Matsuoka, Shingo Ihara, et Kosaku Kinoshita. 2018. « Increased oxidative stress and renal injury in patients with sepsis ». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 63 (2): 137-43. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.17-130>.

570 **Supplementary Material:**

571 Additional Figures 1 to 4 represent the variation in FoldChange of each protein in control and
572 LPS groups according to different analyses: (a) Figure S1-2 for proteins common to the T50
573 and T90 groups; (b) Figure S3 for proteins specific to the T50 group; and (c) Figure S4 for
574 proteins specific to the T90 group.

575 Complementary table 1 corresponds to the results of gene ontology's analysis (GO) which
576 highlighted the most modified cellular components (CC) following the injection of LPS.

577 Complementary tables 2, 3 and 4 include all quantified proteins, unique peptides and the
578 measured coverage and calculated Log2FoldChange according to the 3 levels of analysis we
579 performed: (a) Table S2 for proteins common to groups T50 and T90; (b) Table S3 for
580 proteins specific to group T50; and (c) Table S4 for proteins specific to group T90.

581

Titre : Évaluation du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs du complexe phosphatase

PP1c/GADD34 sur la réponse intégrée au stress au cours d'une circulation extracorporelle.

Mots clés : Circulation extracorporelle, Réponse intégrée au stress, modèle de rat, chirurgie

Résumé : La circulation extracorporelle (CEC) est une procédure *gold standard* en chirurgie cardiaque permettant la suppléance de la fonction cardio-pulmonaire. Le contact entre le sang et les surfaces du circuit initie une inflammation à l'origine d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique et dérégulation de l'homéostasie. Les conséquences associées peuvent entraîner une dysfonction multi-organe chez les patients. Dans ce contexte, il devient urgent de développer de nouveaux moyens pharmacologiques permettant de réduire les conséquences d'une CEC. La modulation de la voie de réponse au stress (ISR), voie de réponse au stress ubiquitaire serait une approche prometteuse ayant déjà fait ses preuves dans d'autres pathologies. L'activation de l'ISR permet la mise en place d'une réponse cellulaire orientée vers la résolution des stress.

L'objectif de ma thèse a été d'évaluer le potentiel effet thérapeutiques de petites molécules inhibitrice du complexe de phosphatase GADD34/PP1c, responsable de la terminaison de l'ISR. Pour cela un modèle de rat mimant une CEC et ses conséquences a été mis au point. La pertinence de ce modèle a été d'abord validé pour un usage préclinique par un monitoring hémodynamique et biochimique et par comparaison des paramètres biochimique avec ceux trouvés chez l'Homme. Enfin, nous avons mis en évidence des effets bénéfiques hémodynamiques, pulmonaires, rénaux, cérébraux après l'administration des molécules, associés à un effet anti-inflammatoire sur ce modèle. Ces effets et les mécanismes associés sont en cours de caractérisation.

Title: Evaluation of the therapeutic potential of inhibitors of the phosphatase complex

PP1c/GADD34 on the integrated stress response during extracorporeal circulation.

Keywords: Cardiopulmonary bypass, integrated stress response, Rat model, Surgery

Abstract: Cardiopulmonary bypass (CPB) is a gold standard procedure in cardiac surgery that aim to replace cardio-pulmonary function. The blood contact with the extrinsic elements of the circuit promotes inflammation leading to a systemic inflammatory response syndrome and homeostasis dysregulation. The consequences of this deregulation can lead to multi-organ dysfunction. In this context, there is an urgent need to develop new pharmacological approach to reduce the consequences of CPB. Modulation of the ubiquitous stress response pathway (ISR) is a promising approach that has already been proven in other pathologies. ISR activation allows an adapted cellular response for the resolution of stress.

The aim of my thesis was to evaluate the therapeutic effect of inhibitors of the GADD34/PP1c phosphatase complex responsible for the termination of ISR. To this purpose, a rat model mimicking CPB was developed. The relevance of this model was first validated for preclinical use by hemodynamic and biochemical monitoring and by comparison to parameters found in humans. Finally, we have demonstrated beneficial effects on hemodynamic, pulmonary, renal, and cerebral parameters after administration of the compounds, associated with an anti-inflammatory effect on this model. These effects and the associated mechanisms are currently being under investigation.