



HAL
open science

La voie de la dipeptidyl peptidase 3 : une nouvelle voie thérapeutique de la défaillance cardiaque aiguë

Benjamin Deniau

► **To cite this version:**

Benjamin Deniau. La voie de la dipeptidyl peptidase 3 : une nouvelle voie thérapeutique de la défaillance cardiaque aiguë. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7088 . tel-03219327

HAL Id: tel-03219327

<https://theses.hal.science/tel-03219327v1>

Submitted on 6 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Paris



Ecole doctorale n°561

Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

UMR-S Inserm 942

Marqueurs cardiovasculaires en situation de stress (MASCOT)

Thèse de biologie

Spécialité « Pathologies cardiovasculaires »

Par **DENIAU Benjamin**

La voie de la dipeptidyl-peptidase 3 :

Une nouvelle voie thérapeutique de la défaillance cardiaque aiguë

Soutenue publiquement le 19 mai 2020

Jury

| | |
|----------------------|--------------------|
| Pr Emmanuel SAMAIN | Président du jury |
| Pr Alexandre MEBAZAA | Directeur de thèse |
| Pr Samir JABER | Rapporteur |
| Dr Stéphane GERMAIN | Rapporteur |
| Pr Isabelle CONSTANT | Examineur |
| Dr Séverine LETUVE | Examineur |
| Dr Philippe BONNIN | Examineur |
| Dr Alice BLET | Examineur |



Université de Paris



Ecole doctorale n°561

Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

UMR-S Inserm 942

Marqueurs cardiovasculaires en situation de stress (MASCOT)

Thèse de biologie

Spécialité « Pathologies cardiovasculaires »

Par **DENIAU Benjamin**

La voie de la dipeptidyl-peptidase 3 :

Une nouvelle voie thérapeutique de la défaillance cardiaque aiguë

Soutenue publiquement le 19 mai 2020

Jury

| | |
|----------------------|--------------------|
| Pr Emmanuel SAMAIN | Président du jury |
| Pr Alexandre MEBAZAA | Directeur de thèse |
| Pr Samir JABER | Rapporteur |
| Dr Stéphane GERMAIN | Rapporteur |
| Pr Isabelle CONSTANT | Examineur |
| Dr Séverine LETUVE | Examineur |
| Dr Philippe BONNIN | Examineur |
| Dr Alice BLET | Examineur |

« Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse »

Nelson Mandela

Remerciements

A Monsieur le Professeur Alexandre Mebazaa

Vous m'avez fait l'honneur de me confier et de diriger ce projet. Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité, votre bienveillance à mon égard et vos brillantes intuitions. Puisse ce travail être le témoin de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Emmanuel Samain

Merci d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail. Puisse ce travail être à la hauteur de vos espérances et vous témoigner ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Samir Jaber

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Vous suivez mon parcours scientifique depuis le début du projet grâce aux comités de suivi de thèse. Merci pour vos remarques et votre bienveillance. Puisse ce travail vous témoigner toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Stéphane Germain

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. J'espère qu'il sera à la hauteur de tes espérances. Au plaisir de continuer à collaborer ensemble sur de nombreux projets.

A Madame le Docteur Alice Blet

Merci pour ton co-encadrement, ton aide indéfectible et ta constante bienveillance à mon égard, dans les moments les plus joyeux mais aussi les plus durs de ce travail. Puisse ce travail te témoigner ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Isabelle Constant

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse. Puisse ce travail vous témoigner toute ma gratitude.

A Madame le Docteur Séverine Letuvé et Monsieur le Docteur Philippe Bonnin

Vous suivez ce projet depuis le début grâce aux comités de suivi de thèse, auxquels vous avez toujours répondu présents. Vos remarques toujours constructives m'ont permis d'avancer. Je vous en suis très reconnaissant.

A ma femme et à mes enfants

Ils sont ma raison de vivre et d'avancer chaque jour. Merci pour votre soutien

A ma famille, à mes parents, à ma belle-famille et à mes proches.

Merci pour votre indéfectible soutien. Vous m'avez toujours soutenu dans mes projets. Puisse ce travail être le témoin de ma sincère gratitude.

A toute l'unité INSERM U942, l'essence même de ce projet

Merci à tous pour votre soutien, vos remarques, votre aide et votre bienveillance. Vous m'avez accueilli et immédiatement intégré parmi les vôtres. Je ne l'oublierai jamais.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Remerciements | 4 |
| Liste des illustrations | 8 |
| Liste des tableaux | 9 |
| Abréviations | 10 |
| Résumé en français..... | 12 |
| Résumé en anglais | 13 |
| Introduction générale..... | 14 |
| 1. Insuffisance cardiaque | 15 |
| a. Définition..... | 15 |
| b. Terminologie | 15 |
| c. Epidémiologie | 16 |
| d. Le choc cardiogénique..... | 18 |
| 2. La dysfonction cardiaque au cours du sepsis..... | 25 |
| a. Définition du sepsis | 25 |
| b. Epidémiologie du sepsis | 26 |
| c. Cardiomyopathie septique | 27 |
| 3. Le système rénine angiotensine aldostérone | 32 |
| a. Physiologie générale du SRAA | 32 |
| b. Rôles du SRAA au cours de l'IC..... | 34 |
| c. SRAA et sepsis..... | 37 |
| 4. Les enképhalines | 39 |
| a. Généralités..... | 39 |
| b. Les enképhalines et la fonction myocardique..... | 40 |
| c. La production endogène cardiaque des enképhalines..... | 41 |
| d. Les récepteurs aux peptides opioïdes | 42 |
| e. Voies de signalisation intracellulaire cardiaque des enképhalines | 44 |
| f. Enképhalines et insuffisance cardiaque..... | 46 |
| 5. Les enképhalinasés | 48 |
| a. Généralités sur les enképhalinasés | 48 |
| b. Les dipeptidyl peptidases (DPP) | 49 |
| c. La dipeptidyl peptidase-3 (DPP3) | 50 |
| Objectifs généraux du travail | 60 |
| Article 1 | 63 |
| Rôle de DPP3 dans la défaillance hémodynamique du choc cardiogénique : résultats de l'étude OptimaCC..... | 63 |
| 1. Introduction | 64 |
| 2. Publication dans <i>European Journal of Heart Failure</i> (2019) | 66 |
| 3. Discussion | 75 |
| Article 2..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor : dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics | 78 |
| 1. Introduction | 79 |
| 2. Publication dans <i>European Journal of Heart Failure</i> (2019) | 80 |
| 3. Discussion | 91 |
| Article 3 | 94 |
| Circulating dipeptidyl-peptidase 3 inhibition restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: a proof of concept study | 94 |
| 1. Introduction | 95 |
| 2. Publication (en cours de soumission dans <i>Shock</i>) | 97 |
| 3. Discussion | 123 |
| Discussion générale | 125 |
| Perspectives générales | 136 |
| Conclusion générale | 138 |
| Bibliographie | 140 |

Liste des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1 : répartition et évolution des trois catégories d'insuffisance cardiaque de 2005 à 2010 d'après le registre American Heart Association's GWTH-HF | 18 |
| Figure 2: nouvelle définition du sepsis (d'après Singer) | 26 |
| Figure 3: mécanismes physiopathologiques de la cardiomyopathie septique | 29 |
| Figure 4: vue générale du système rénine angiotensine aldostérone | 34 |
| Figure 5 : schéma représentatif des mécanismes neuro-hormonaux activés lors de l'IC. | 35 |
| Figure 6 : structure de la Met-enképhaline | 39 |
| Figure 7 : schéma de la voie de production des enképhalines depuis la proenképhaline. | 41 |
| Figure 8: voies de signalisation intracellulaire commune aux récepteurs opioïdes et aux récepteurs β adrénergiques..... | 44 |
| Figure 9 : schéma récapitulatif du cycle d'activation et de désactivation du récepteur couplé aux protéines G lors de la liaison avec son agoniste. | 45 |
| Figure 10 : voie de signalisation cellulaire suivant l'activation du récepteur couplé aux protéines G par les enképhalines..... | 46 |
| Figure 11 : sites de clivage des enképhalines en fonction des enzymes..... | 48 |
| Figure 12: rôle de DPP3 dans le renouvellement protéique cellulaire | 55 |
| Figure 13 : rôles de la DPP3 au cours du stress oxydant cellulaire..... | 58 |
| Figure 14 : schéma récapitulatif des principaux rôles de la DPP3 | 59 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : catégorisation de la sévérité de l'insuffisance cardiaque selon la fraction d'éjection du ventricule gauche..... | 16 |
| Tableau 2 : ancienne et nouvelle définitions du sepsis..... | 25 |
| Tableau 3: principaux facteurs dépresseurs myocardiques connus impliqués dans le sepsis..... | 31 |
| Tableau 4 : récepteurs cellulaires du SRAA..... | 33 |
| Tableau 5: effets cardiovasculaires de la stimulation centrale et périphérique des récepteurs aux opioïdes | 40 |
| Tableau 6 : agonistes et antagonistes des principaux récepteurs aux opioïdes..... | 42 |
| Tableau 7 : caractéristiques des différentes dipeptidyl peptidases chez les mammifères | 49 |
| Tableau 8 : principaux substrats de la DPP3 | 53 |

Abréviations

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

ADM : adrénomédulline

AMP : adénosine mono phosphate

AT1 : récepteur de l'angiotensine 2 de type 1

AT2 : récepteur de l'angiotensine 2 de type 2

AT4 : récepteur de l'angiotensine 2 de type 4

ATP : adénosine triphosphate

CLP : caecal ligation and puncture

CS : cardiomyopathie septique

DHE : dihydroethidium

DPP : dipeptidyl peptidase

EM : endomorphines

FDM : facteur dépresseur myocardique

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche

HO1 : heme oxygenase 1

IC : insuffisance cardiaque

IL-1 β : interleukine 1 β

IL-6 : interleukine 6

IP3 : inositol triphosphate

ISO : isoprotérénol

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

LPC : ligature et ponction caecale

LPS : lipopolysaccharide

MIF : macrophage migration inhibitory factor

NO : monoxyde d'azote

NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1

Nrf2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)

pAKT/AKT : PI3K-AKT pathway

PCZ : Procizumab

SERCA2a : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase

SOFA : Sepsis-related Organ Failure Assessment

SRAA : système rénine angiotensine aldostérone

TNF α : tumor necrosis factor α

TOP : thimet oligopeptidase

TPP : tripeptidyl peptidase

Résumé en français

Introduction

L'insuffisance cardiaque (IC) aiguë est une pathologie multifactorielle responsable du décès de plusieurs millions de personnes chaque année. Sa physiopathologie est complexe et non entièrement élucidée. De plus, les traitements actuels ne permettent pas d'éviter le décès des patients les plus graves. La dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) est une métalloprotéinase ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus biologiques, notamment dans la régulation de la pression artérielle (en clivant l'angiotensine 2). Son taux plasmatique est très élevé dans le choc cardiogénique et le choc septique. Les fonctions biologiques exactes de la DPP3 sont inconnues à ce jour. Les objectifs de ce travail étaient de déterminer les fonctions physiopathologiques de la DPP3, particulièrement ses effets cardiaques et rénaux, au cours de l'IC aiguë d'origine catécholaminergique et septique.

Méthodes

Deux modèles ont été utilisés dans ce travail : 1/ le modèle d'IC aiguë à l'isoprotérénol (ISO, 300 mg/kg/12h) chez des souris mâles C57Bl6j de 3 mois et 2/ le modèle d'IC aiguë septique chez des rats mâles Wistar de 3 mois par ligature et ponction caecale (LPC). Les paramètres cardiovasculaires (dans les deux modèles) et rénaux (dans le modèle ISO) ont été évalués par échographie. Nous avons exploré le stress oxydant myocardique par marquage DHE sur des coupes de cœur. Des dosages d'angiotensines *in vitro* en présence de DPP3 ont été réalisés chez la souris.

Résultats

L'injection de la protéine DPP3 chez la souris saine était responsable d'une dépression myocardique (baisse de $10 \pm 2\%$ de la fraction de raccourcissement) ainsi que d'une altération de l'hémodynamique rénale (augmentation de l'index de résistance rénale de 0.30 ± 0.02). De plus, l'ajout *in vitro* de DPP3 avec le plasma de souris *ex vivo* était associée à une baisse des taux de toutes les angiotensines. 1/ Dans le modèle d'IC aiguë à l'ISO, l'inhibition de la DPP3 par le Procizumab normalisait rapidement la fonction cardiaque ainsi que l'hémodynamique rénale avec une réduction marquée du stress oxydant et de l'inflammation myocardique. 2/ Dans le modèle de cardiomyopathie septique chez le rat, l'injection de Procizumab permettait de normaliser rapidement la fraction de raccourcissement et le débit cardiaque des animaux septiques. Une réduction du stress oxydant était observée dans le cœur des animaux traités. De plus, la mortalité des animaux septiques traités par le Procizumab était réduite.

Conclusion

Notre étude démontre que la DPP3 est un facteur dépresseur myocardique et que son par le Procizumab, un anticorps spécifique de la DPP3, permettait d'améliorer la contraction myocardique, l'hémodynamique rénale et d'améliorer la survie des animaux. Cet anticorps pourrait être une option thérapeutique intéressante dans les états de chocs cardiogéniques et septiques les plus graves. Cependant, les mécanismes d'action du Procizumab ne sont pas encore élucidés. Une modulation des taux circulants des acteurs du système rénine angiotensine aldostérone et notamment de l'angiotensine 2 est l'hypothèse retenue actuellement. Elle devra être confirmée par des études expérimentales et cliniques.

Résumé en anglais

Introduction

Acute heart failure (AHF) is a high mortality multifactorial disease. Pathophysiology of AHF is not completely understood. Moreover, therapeutics are insufficient to prevent death in worst cases. Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a predominantly intracellular ubiquitous metallopeptidase mainly involved in blood pressure regulation by cleaving angiotensin 2. Exact biological functions of DPP3 are unknown. Aims of this work were to study pathophysiological functions of DPP3, particularly cardiac and renal effects, in catecholaminergic and septic AHF.

Methods

We used two AHF induced models: 1/ isoproterenol injection (ISO, 300 mg/kg/12h) in 3-month-old C57Bl6j male mice and 2/ septic shock with cardiomyopathy induced by cecal and ligation puncture in 3-month-old Wistar rats. Cardiovascular (in both models) and renal (in ISO model) parameters were assessed by echography and ultrasounds. Myocardial oxidative stress was assessed by DHE staining in heart. We measured *in vitro* the angiotensin peptides by mass spectrometry finger printing in mice.

Results

DPP3 injection altered cardiac contractility ($-10 \pm 2\%$ of shortening fraction) and kidney hemodynamics ($+0.30 \pm 0.02$ of renal resistive index). In addition, DPP3 decreased all angiotensins in mice plasma samples. 1/ In AHF induced model by ISO in mice, inhibition of DPP3 by Procizumab promptly normalized cardiac function and kidney hemodynamics with a reduced myocardial oxidative stress and inflammation. 2/ In AHF induced by sepsis model in rats, Procizumab quickly improved shortening fraction and cardiac output. Myocardial oxidative stress was reduced in septic treated animals by Procizumab. Moreover, inhibition of DPP3 in septic animals improved survival when compared to control animals.

Conclusion

Our study demonstrates that DPP3 is a myocardial depressant factor and its inhibition by Procizumab, a specific antibody directed against DPP3, improved cardiac contractility, kidney hemodynamics and survival. Procizumab could be an interesting therapeutic in cardiogenic and septic shock. However, mechanisms of action of Procizumab are currently not understood. Modulation of renin-angiotensin-aldosterone system, notably angiotensin 2, could be the main hypothesis. Experimental and clinical studies are urgently needed.

Introduction générale

Introduction générale

1. Insuffisance cardiaque

a. Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est définie comme un syndrome associant des signes fonctionnels (dyspnée, asthénie et œdèmes déclives) et des signes cliniques (turgescence jugulaire, râles crépitants...) causé par une anomalie fonctionnelle et/ou structurelle cardiaque et ayant pour conséquence directe une augmentation des pressions de remplissage du ventricule gauche au repos ou en situation de stress, et dans les formes les plus graves une réduction du débit cardiaque (1). Véritable défi diagnostique, les patients atteints d'IC peuvent rester longtemps asymptomatiques. Le diagnostic rapide est un critère pronostique important car sa précocité et l'initiation des thérapeutiques sont associées à une réduction de la mortalité (2, 3).

b. Terminologie

La définition de l'IC chronique est basée sur :

- La présence de signes cliniques évocateurs de la maladie
- La mesure échographique de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG).

Trois grandes catégories d'insuffisance cardiaques sont décrites à ce jour (1):

- HFpEF (Heart Failure with preserved Ejection Fraction) définie par une valeur de FEVG supérieure à 50%
- HFrEF (Heart Failure with reduced Ejection Fraction) définie par une valeur de FEVG inférieure à 40%
- HFmEF (Heart Failure with mid-range Ejection Fraction) définie par une valeur de FEVG comprise entre 40 et 50%, considérée comme une zone grise entre l'HFpEF et l'HFrEF.

La différenciation des catégories d'IC chronique selon le chiffre de la FEVG est importante étant donné les différences existantes en termes d'étiologies, de caractéristiques démographiques, de comorbidités et de réponses aux thérapeutiques. Le tableau 1 regroupe les différents types d'IC (1).

| Type | | HFrEF | HFmrEF | HFpEF |
|----------|---|------------|---|---|
| Critères | 1 | Symptômes | Symptômes | Symptômes |
| | 2 | FEVG < 40% | FEVG 40-49% | FEVG ≥ 50% |
| | 3 | | - Elévation peptides natriurétiques - Anomalie cardiaque structurale et/ou dysfonction diastolique | - Elévation peptides natriurétiques - Anomalie cardiaque structurale et/ou dysfonction diastolique |

Tableau 1 : catégorisation de la sévérité de l'insuffisance cardiaque selon la fraction d'éjection du ventricule gauche.

L'IC aiguë correspond à l'apparition ou à l'aggravation rapide des symptômes et/ou des signes cliniques d'IC (1). Il s'agit d'une situation urgente, associée à une mortalité élevée, requérant une évaluation médicale ainsi qu'une prise en charge thérapeutique en urgence. L'IC aiguë peut se présenter *de novo* (patient qui n'était pas connu pour être atteint d'IC) ou, plus fréquemment, sous forme de décompensation aiguë d'une IC chronique. L'IC aiguë peut être secondaire à une dysfonction cardiaque primaire ou à un facteur extrinsèque précipitant une IC chronique. Les étiologies les plus fréquentes d'IC aiguë secondaire à une dysfonction cardiaque aiguë sont la dysfonction myocardique (d'origine ischémique, inflammatoire et toxique), l'insuffisance valvulaire aiguë et la tamponnade péricardique (1). De nombreux facteurs extrinsèques peuvent décompenser une IC chronique et mener à un tableau d'IC aiguë (infections, poussée d'hypertension artérielle non contrôlée, des troubles du rythmes ou encore le manque d'observance thérapeutique) (1).

c. Epidémiologie

L'IC chronique est un problème de Santé Publique majeur, affectant plus de 26 millions de personnes dans le monde (4). Aux Etats-Unis, la prévalence de la maladie atteint 5,7 millions d'individus avec 670.000 nouveaux cas chaque année (5, 6). En Europe, l'IC touche 15 millions de personnes (7, 8) et correspond à la première cause d'hospitalisation (soit 1 million d'admissions annuelles) (5, 8-10). L'âge

moyen des patients hospitalisés pour IC (diagnostic initial) est de 72.5 ± 15 ans (4). Ces chiffres diffèrent selon la localisation géographique des patients étudiés. Les femmes représentent 40 à 50% des patients hospitalisés pour IC (4), avec un âge plus avancé et une proportion plus importante de HFpEF au moment du diagnostic (4, 11). Après ajustement sur les caractéristiques initiales des patients, le devenir des femmes est comparable à celui des hommes (12).

L'origine ischémique reste la principale étiologie d'IC, quelle que soit la localisation géographique (4), suivie par l'hypertension artérielle, les valvulopathies et les malformations cardiaques d'origine congénitale (4).

L'HFpEF représente 50 à 60% des IC (13). Ce chiffre est approximatif car, étonnamment, la mesure de la FEVG à l'admission des patients est manquante dans de nombreux registres. De plus, la proportion exacte de patients atteints de HFpEF développant dans un second temps une HFrEF est inconnue étant donné l'évolution silencieuse de la maladie (13–15). Les données issues du registre American Heart Association's GWTH-HF (Get With The Guidelines – Heart Failure) suggère que la proportion de patients atteints de HFpEF croit de façon constante et pourrait dépasser celle de la HFrEF dans les années à venir (figure 1 d'après (16)).

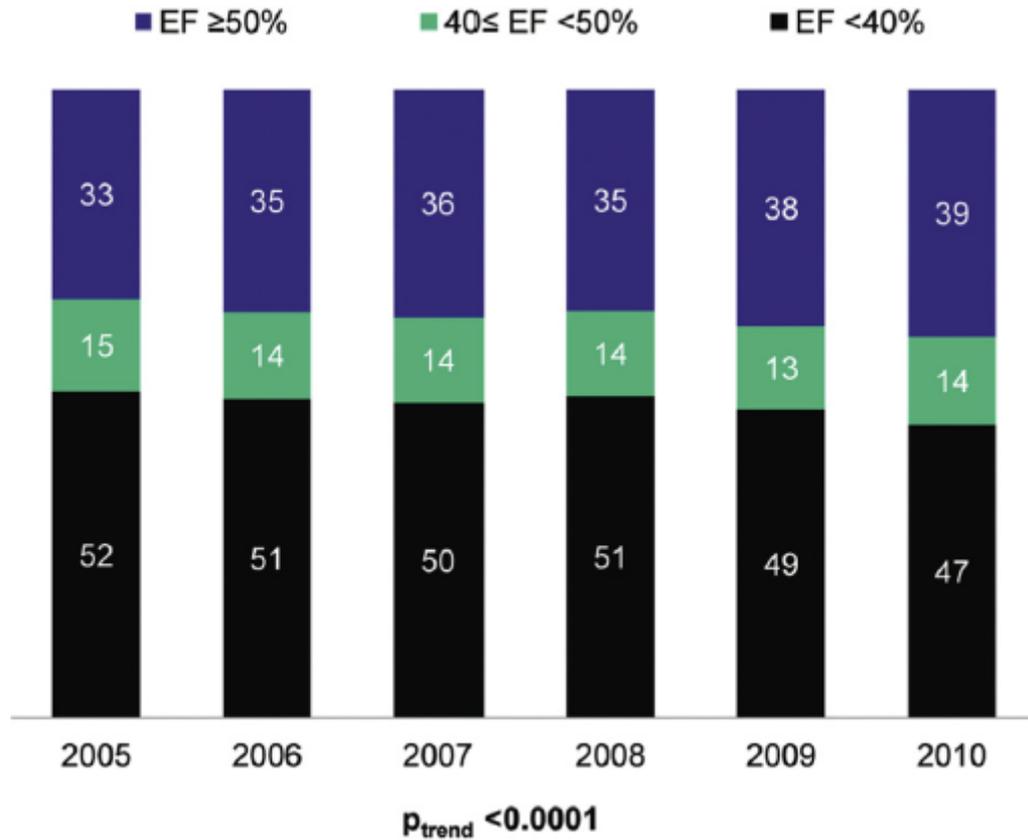


Figure 1 : répartition et évolution des trois catégories d'insuffisance cardiaque de 2005 à 2010 d'après le registre American Heart Association's GWTH-HF

d. Le choc cardiogénique

1. Généralités

Le choc cardiogénique est stade le plus grave de l'IC aiguë (17, 18). Il correspond à l'incapacité du cœur à délivrer une quantité suffisante de sang aux tissus et associe des critères hémodynamiques : pression artérielle systolique <90 mmHg et/ou pression artérielle pulmonaire moyenne inférieure à 30 mmHg par rapport à la valeur de base, associée à une diminution de l'index cardiaque (<1,8 L/min/m² en absence de support inotrope, ou <2,2 L/min/m² avec support inotrope) et des pressions de remplissage ventriculaires gauches augmentées (pression de remplissage télédiastolique >18 mmHg) et cliniques (hypoperfusion tissulaire avec extrémités froides, oligo-anurie et/ou altération des fonctions supérieures (17). Cinq à 10% des infarctus du myocarde se compliquent de choc cardiogénique (19). Ce chiffre est en diminution depuis l'avènement de la revascularisation (percutanée ou chirurgicale) précoce (17). De

plus, la thrombolyse rapidement initiée a permis de réduire significativement la survenue du choc cardiogénique (20, 21). Le choc cardiogénique est la première cause de mortalité intra hospitalière chez les patients atteints d'infarctus du myocarde (22). Sa mortalité avoisine les 40% malgré une optimisation de la prise en charge au cours des dernières décennies (23, 24). Les patients survivants ont un pronostic à long terme identique aux patients atteints d'IC aiguë non compliqué de choc cardiogénique (25, 26) soulignant donc l'importance de la prise en charge très précoce de ces patients. La principale étiologie des chocs cardiogéniques compliquant un infarctus du myocarde est l'ischémie myocardique, dont la prise en charge, basée sur la revascularisation coronaire, doit être la plus précoce possible (18).

2. *Prise en charge du choc cardiogénique*

- Thérapeutiques médicamenteuses

Optimisation volémique

L'IC aiguë est caractérisée par 4 profils hémodynamiques cliniques (17). Cette classification est basée sur la présence ou non d'une congestion (« dry » ou « wet ») et de la présence ou non d'une perfusion périphérique adéquate (« chaud » ou « froid »). Le profil du patient est associé à son pronostic et permet de guider la thérapeutique (17). Dans la plupart des cas, le patient en état de choc cardiogénique présente des signes de congestion (e.g. orthopnée, reflux hépato-jugulaire) qui contre indiquent le remplissage vasculaire et imposent alors un support inotrope pour assurer une perfusion périphérique adéquate (17). Chez les patients ne présentant pas de signe de congestion, le remplissage vasculaire est possible, par petit volume (250 mL) et avec une grande précaution, dans le but d'optimiser la volémie, d'augmenter les pressions de remplissage et d'améliorer le débit cardiaque. En absence de preuve formelle et dans l'attente d'essais cliniques de niveau de preuve suffisant, il semble raisonnable de choisir les solutés cristalloïdes comme solutés de première ligne pour le remplissage vasculaire du patient en état de choc cardiogénique (27). L'agence européenne du médicament (EMA) et l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) contre-indiquent l'utilisation des Hydroxyéthylamidons (HEA) chez le patient de réanimation (28).

Agents vasopresseurs

En cas d'hypotension artérielle réfractaire à un remplissage vasculaire ou en cas de contre-indication, l'utilisation de vasopresseurs est nécessaire pour maintenir la pression de perfusion tissulaire (17, 18). Plusieurs travaux sont en faveur de l'utilisation de la noradrénaline et en défaveur de l'adrénaline et/ou de la dopamine (29–31). En règle générale, les agents vasopresseurs doivent être utilisés aux doses les plus basses possibles et pendant la durée la plus restreinte (18). De plus, tous les agents vasopresseurs ont des effets indésirables différents à des doses différentes rendant délicate l'interprétation des différentes études les concernant (18). Ainsi, il est recommandé d'adapter l'agent vasopresseur (type, dose et durée) en fonction de la présentation clinique, des résultats biologiques et du statut hémodynamique du patient (18). Lorsque la pression artérielle doit être rapidement augmentée, la noradrénaline semble être l'agent de choix (18). Dans l'étude SOAPII, qui comparait l'utilisation de la noradrénaline à la dopamine comme vasopresseur de première intention dans différents types d'états de choc, aucune différence sur la mortalité n'a été retrouvée, mais l'utilisation de la dopamine était associée à une augmentation de l'incidence des arythmies (32).

Agents inotropes

Etant donné que le débit cardiaque est réduit au cours du choc cardiogénique, l'introduction d'un agent inotrope pourrait aider à augmenter le volume d'éjection systolique après la stabilisation du statut hémodynamique du patient (18). Aucune preuve de supériorité d'un agent inotrope n'a été démontrée dans la prise en charge du choc cardiogénique (17, 18). Historiquement la dobutamine est considérée comme l'agent inotrope de choix (17). Malgré un effet bénéfique sur l'hémodynamique au cours du choc cardiogénique via une augmentation du débit cardiaque, la dobutamine présente de nombreux effets secondaires tels que l'augmentation de la consommation myocardique en oxygène (17) et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique, qui a pour conséquence d'augmenter

la concentration de calcium intracellulaire et d'induire la mort cellulaire (17), augmentant alors le risque de survenue d'arythmies cardiaques (17). En cas de choc cardiogénique associant un bas débit cardiaque et une perfusion périphérique maintenue, la dobutamine semble être l'agent inotrope à initier (à la dose de 2,5 µg/kg/min) pour restaurer rapidement le débit cardiaque (18). Dans l'étude ADHERE, l'utilisation à la phase aiguë de l'IC d'agents inotropes était associée à une augmentation de la mortalité intra-hospitalière (33). Ainsi, les agents inotropes doivent être utilisés uniquement en cas de nécessité absolues et aux doses les plus basses possibles.

D'autres agents inotropes sont disponibles. La milrinone est un inhibiteur de la phosphodiesterase III (34). Elle a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMP cyclique, améliorant la contractilité myocardique (34). Contrairement à la dobutamine, la milrinone n'augmente pas la consommation myocardique en oxygène (17). Cependant, l'augmentation en AMP cyclique s'accompagne d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, avec une augmentation du risque de mort cellulaire, d'extension de la zone ischémique et du risque d'arythmies (17). Dans le choc cardiogénique, l'utilisation de la milrinone a été limitée étant donnée sa demi-vie longue et le risque important d'hypotension artérielle. Elle peut cependant garder un intérêt en cas de défaillance cardiaque droite prédominante car elle diminue la post charge par un phénomène de vasodilatation artérielle pulmonaire (17). Ceci reste cependant à confirmer.

Le levosimendan est un agent inotrope atypique par le fait qu'il agit via un double mécanisme (35–38) :

- il augmente la sensibilité de la troponine C au calcium (activité inotrope et lusitrope positive (39))
- il active l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendants des cellules musculaires lisses des vaisseaux (activité vasodilatatrice (39)).

Le levosimendan pourrait être l'agent inotrope idéal dans le traitement du choc cardiogénique puisqu'il améliore la contractilité cardiaque sans augmenter la concentration intracellulaire de calcium (17).

Comparé aux inhibiteurs de la phosphodiesterase III, le levosimendan améliore la survie des patients (40). Son efficacité n'a pas été comparée à la dobutamine. Une récente méta analyse incluant 648 patients en choc cardiogénique concluait à une amélioration des paramètres hémodynamiques des patients sous levosimendan sans réduction de la mortalité, ni des scores de gravité (tels que le SOFA), ni de la durée d'hospitalisation (41). Le levosimendan est utilisable chez les patients traités chroniquement par β -bloquants étant son action inotrope indépendante de toute stimulation β -adrénergique (18).

D'autres agents inotropes sont disponibles mais ne sont pas à considérer en première intention dans la prise en charge du choc cardiogénique. Il s'agit notamment de la dopamine (dont la mortalité était plus élevée lorsqu'elle était comparée à la noradrénaline, et accompagnée d'un taux plus important d'arythmies (32)), de l'adrénaline (associée à une augmentation du taux de lactate (29–31), et une mortalité précoce plus élevée (29, 31, 42)), et de la vasopressine (pas de modification de l'index cardiaque chez les patients traités (43)). D'autres thérapeutiques médicamenteuses ont été testées au cours du choc cardiogénique (inhibition de la NO synthase (44), istaroxime (45) etc) sans qu'aucun bénéfice n'ait été démontré.

Depuis quelques années, les effets néfastes des catécholamines sur la mortalité ont été démontrés de façon répétée (31, 42, 46). Des traitements inotropes et/ou vasopresseurs avec des effets secondaires moindres sont nécessaires pour la prise en charge des patients atteints de choc cardiogénique.

- Thérapeutiques non médicamenteuses

Revascularisation précoce

La revascularisation artérielle en cas de choc cardiogénique d'origine ischémique est le traitement étiologique à initier en extrême urgence (17, 18). Etant donné que son efficacité est limitée, la fibrinolyse

doit être réservée pour le traitement des syndromes coronariens aigus avec sus décalage du segment ST (SCA-ST+) et lorsque l'angioplastie coronaire n'est pas disponible (18, 47). L'essai SHOCK est considéré comme l'étude de référence dans la prise en charge du choc cardiogénique (48). Bien que la revascularisation précoce (par abord percutanée ou chirurgical) ne réduisait pas la mortalité à 30 jours dans cet essai (critère de jugement principal), les auteurs ont démontré une réduction de la mortalité à 6 mois (25). Depuis la diffusion des recommandations mettant au centre de la prise en charge la revascularisation coronarienne précoce (49, 50), il a été observé dans de nombreux registres une réduction très claire de la mortalité du choc cardiogénique d'origine ischémique chez les sujets jeunes comme chez les sujets âgés (51, 52). Le type de revascularisation (percutanée ou chirurgicale) ne semble pas influencer le pronostic des patients (53, 54), bien que moins de 4% des revascularisations soient chirurgicales (51, 55).

Assistance circulatoire

Le rationnel de l'utilisation de l'assistance circulatoire dans le choc cardiogénique est d'assurer une perfusion de tous les organes et des artères coronaires tout en diminuant la consommation myocardique en oxygène. De nombreux systèmes d'assistance circulatoire existent aujourd'hui.

Aucun bénéfice du ballon de contre pulsion intra-aortique au cours du choc cardiogénique n'a été démontré (55). De ce fait, les recommandations récentes sur la prise en charge du choc cardiogénique recommandent l'utilisation de ce type d'assistance uniquement chez les patients présentant des complications mécaniques (49). D'autres systèmes d'assistance circulatoire ont été développés plus récemment dans le but d'améliorer la perfusion coronaire et l'hémodynamique des patients en choc cardiogénique (56, 57). Les plus connus sont les systèmes TandemHeart™ (Cardiac Assist, Pittsburgh, USA), Impella© (Abiomed Europe, Aachen, Allemagne), Heartmate® (St Jude Medical Inc. St Paul, USA) ou bien encore l'ECMO AV (extracorporeal membrane oxygenation artério veineuse). Malheureusement, aucun de ces systèmes n'a encore démontré son efficacité au cours du choc

cardiogénique (58) et leur utilisation reste exceptionnelle car très invasifs ils restent réservés aux centres de référence (18).

En conclusion, le choc cardiogénique reste une complication extrêmement grave de l'IC aiguë d'origine ischémique, responsable du décès de plusieurs milliers de patients chaque année. La prise en charge repose principalement sur le traitement étiologique ainsi qu'un traitement symptomatique basé sur une réanimation hémodynamique optimale, incluant remplissage vasculaire, agents inotropes et vasopresseur. En dehors de la revascularisation coronaire en urgence si l'origine du choc est ischémique, aucun traitement symptomatique (médicamenteux ou non médicamenteux) n'a démontré son efficacité dans la prise en charge de cette pathologie, soulignant bien la nécessité de développer de nouvelles thérapeutiques dans le but de réduire la mortalité de ces patients

2. La dysfonction cardiaque au cours du sepsis

a. Définition du sepsis

Le sepsis est une pathologie fréquente, grave, responsable du décès de plusieurs millions de personnes dans le monde chaque année (59, 60). Bien qu'il ait été décrit depuis très longtemps, le sepsis n'a été que clairement défini à la fin du 20^e siècle (59).

Le sepsis est un syndrome caractérisé par des anomalies physiologiques, pathologiques et biochimiques causé par une infection bactérienne, virale, parasitaire ou fongique (60). Au début des années 1990, l'American College of Chest Physicians et la Society of Critical Care Medicine avaient défini le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique (61) (tableau 1). En 2016, la troisième Conférence Internationale de Définition du sepsis et du choc septique (Sepsis-3) a redéfini le sepsis comme « une défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse dérégulée de l'hôte vis-à-vis d'une infection » (60) (tableau 2). L'accent est mis sur la notion de réponse dérégulée de l'hôte vis-à-vis de l'infection pour le différencier d'une réponse appropriée, normale à une infection, qui ne mène pas à des défaillances d'organes (60).

| Ancienne définition | |
|--------------------------------|--|
| SIRS | Au moins 2 critères parmi <ul style="list-style-type: none">• Température < 36 °C ou > 38°C• Fréquence cardiaque supérieure à 90 battements par minute• Fréquence respiratoire supérieure à 20 par minute ou pression partielle artérielle en CO₂ < 32 mmHg• Leucocytes >20 G/L ou <4 G/L |
| Sepsis | SIRS + infection documentée |
| Sepsis sévère | Sepsis avec défaillance d'organe aiguë (hypotension artérielle, acidose lactique, oligurie, baisse du rapport PaO ₂ /FiO ₂ , augmentation de la créatinine ou de la bilirubinémie, thrombocytopenie, anomalie de la coagulation) |
| Choc septique | Sepsis persistant malgré un remplissage vasculaire optimal |
| Nouvelle définition (Sepsis-3) | |
| Sepsis | Défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse dérégulée de l'hôte vis-à-vis d'une infection |
| Choc septique | Sepsis nécessitant un support vasopresseur pour maintenir une pression artérielle moyenne >65 mmHg, associé à une hyperlactatémie plasmatique >2 mmol/L, malgré un remplissage vasculaire optimal |

Tableau 2 : ancienne et nouvelle définitions du sepsis

La dysfonction d'organe est définie comme une modification du score SOFA d'au moins 2 points due à une infection. Le score SOFA peut être considéré comme égal à zéro si le patient n'est pas connu atteint de défaillances d'organes préexistantes.

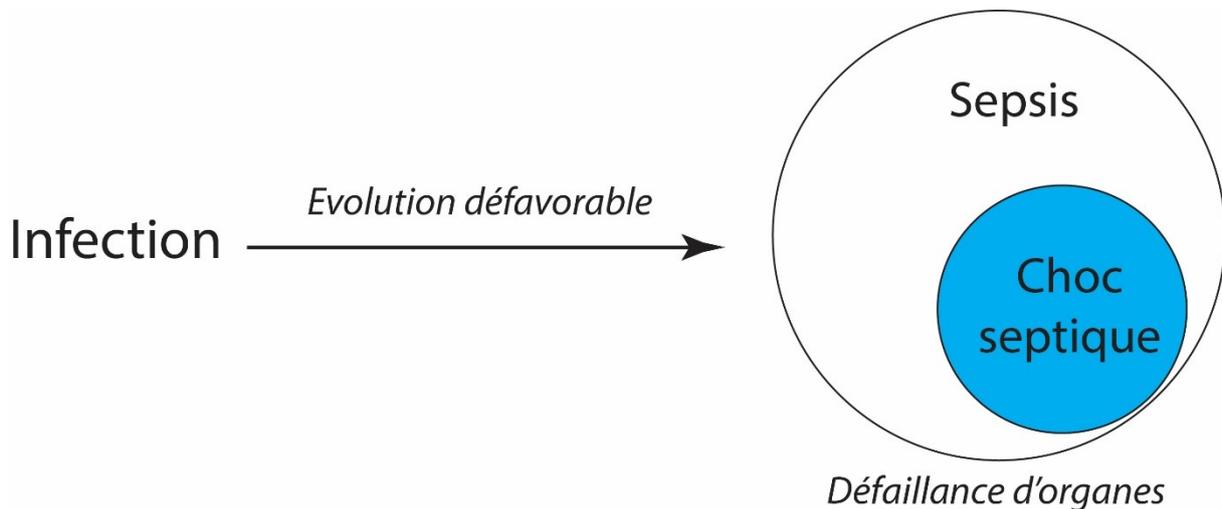


Figure 2: nouvelle définition du sepsis (d'après Singer)

b. Epidémiologie du sepsis

L'incidence précise du sepsis est aujourd'hui inconnue (62), elle varie en fonction de la définition utilisée, du germe responsable, du mécanisme de l'infection et de la présence de défaillance d'organe (nécessitant alors une prise en charge en Réanimation) (62). La plupart des données épidémiologiques du sepsis proviennent des pays développés, où la mortalité qui lui est imputable s'élève à 2,8 millions de décès par an (63). En 2001, Angus rapportait qu'aux Etats –Unis d'Amérique, l'incidence du sepsis sévère s'élevait à 750 000 cas par an (soit 300 cas pour 100 000 habitants), équivalent à 2.26 cas pour 100 patients hospitalisés (64). En Grande Bretagne, le sepsis correspondait à 27% des admissions en Réanimation, alors qu'elle était de 12% aux Etats Unis à la même période (65, 66), témoignant de la discordance des données épidémiologiques selon les pays. Ceci peut s'expliquer par le nombre de lits disponibles en Réanimation et en Soins Continus plus important aux Etats Unis qu'en Grande Bretagne, ainsi que les critères d'admission différents dans ces deux pays (62). De façon plus générale, il est très

probable que l'incidence du sepsis soit sous-estimée, la population vieillissant, ce phénomène va continuer de s'accroître (62). Les données récentes estiment que le sepsis correspond à la 3^e cause de décès intra-hospitalière aux Etats Unis en 2014 (67), avec une mortalité variant de 20 à 50% selon les études (60, 62, 64, 68). Bien que ces données soient issues de registres de pays développés, la mortalité est très probablement plus élevée dans les pays en voie de développement mais l'incidence exacte du sepsis y est inconnue et difficile à estimer (62). Grâce aux progrès scientifiques et médicaux réalisés sur les trois dernières décennies passées en terme de Réanimation et de support d'organes, la mortalité du sepsis est passée de 80% il y a 30 ans à 20-30% aujourd'hui (64, 69). La mortalité du sepsis reste cependant très élevée. La pneumonie est l'étiologie de sepsis la plus fréquente, représentant la moitié des cas, suivie par les infections intra-abdominales et urinaires (64).

Au final, le sepsis demeure un défi mondial pour la santé publique, et correspond à un problème de santé publique majeur.

c. Cardiomyopathie septique

Généralités

La cardiomyopathie septique (CS) est un diagnostic souvent posé lorsqu'il existe des perturbations cardiaques chez un patient atteint de sepsis (70). A ce jour, il n'existe pas de définition consensuelle de la CS. La complexité du système cardiovasculaire et les différents tableaux cliniques que peuvent prendre la CS rendent son diagnostic très difficile. La CS a été décrite il y a 40 ans (71, 72). Par manque de définition précise, la CS est sous diagnostiquée et son incidence exacte n'est pas connue mais semblerait atteindre 44% des patients septiques (73, 74). La mortalité du sepsis compliqué de CS est 2 à 3 fois plus élevée que le sepsis sans atteinte cardiaque (75, 76). Il s'agit donc d'un véritable défi diagnostique et pronostique chez le patient septique.

Physiopathologie de la CS

La cascade physiopathologique du sepsis débute lorsque le système immunitaire de l'hôte répond à l'invasion d'un pathogène par l'activation de la réponse immunitaire innée (77). Cette activation va être responsable de la génération et de la libération de médiateurs pro et anti-inflammatoires qui peuvent être bénéfiques mais aussi délétères chez l'hôte (70). Ces molécules libérées vont activer des voies de signalisation cellulaire, et moduler l'expression de gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire de l'hôte (70, 78). Au final, le sepsis va induire des modifications du système immunitaire de l'hôte (génération de médiateurs et modification de l'expression de gènes) pouvant avoir des effets systémiques délétères responsables de défaillance d'organes, et notamment cardiaque, pouvant aller jusqu'au décès du patient (75).

Initialement, la physiopathologie de la CS était simplement limitée à une ischémie myocardique généralisée secondaire à une réduction du flux coronaire lié au bas débit du choc septique (79). Des investigations, notamment chez l'Homme, démontreront par la suite que la perfusion coronarienne est maintenue voir augmentée au cours du sepsis et qu'il n'y a pas de nécrose myocardique associée (80). Puis l'hypothèse de modifications cardiomyocytaires induites par le sepsis a été soulevée (81) notamment par des effets pléiotropes des médiateurs pro-inflammatoires libérés au cours de la réponse immunitaire innée (75). Ces médiateurs vont être responsables de modifications de la perméabilité endothéliale avec la formation d'œdèmes, d'une augmentation de l'infiltration interstitielle par les polynucléaires neutrophiles, d'une augmentation des dépôts de fibrine, et d'une activation de la coagulation (82). En parallèle, la libération d'espèces réactives de l'oxygène va être responsable d'une augmentation du stress oxydant, induisant une dysfonction mitochondriale et une altération du métabolisme du calcium (83). Il ne semble pas qu'un mécanisme physiopathologique prédomine sur les autres, mais les mécanismes responsables d'œdèmes myocardiques ayant des effets directs sur la contractilité cardiaque semble être les phénomènes prédominants (84). Enfin, une altération du système nerveux autonome secondaire au sepsis peut être responsable d'une diminution de l'expression des récepteurs adrénergiques et induire

une résistance aux catécholamines endogènes. La figure 3 résume les principaux éléments physiopathologiques impliqués dans le développement de la CS (d'après (70)).

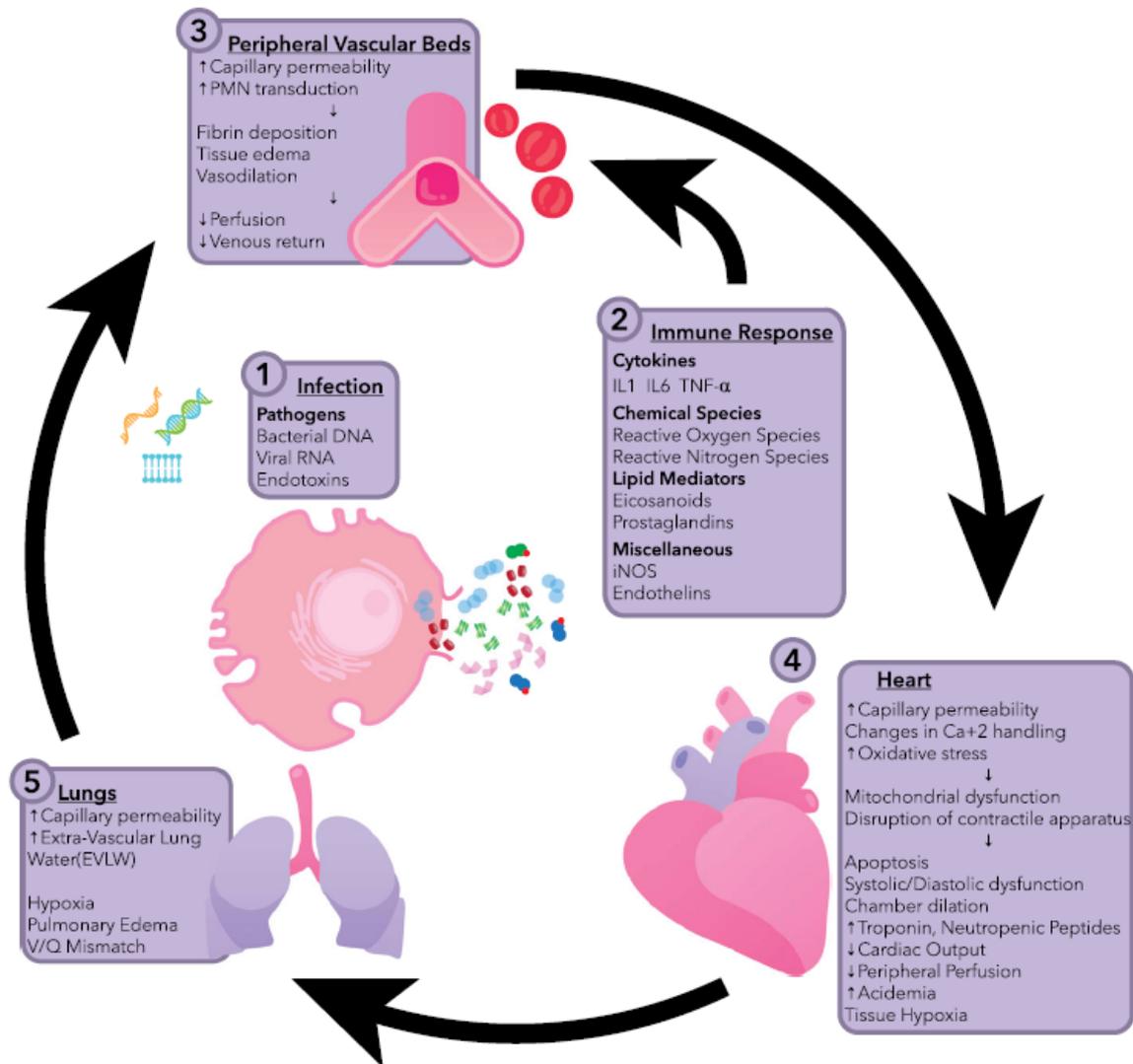


Figure 3: mécanismes physiopathologiques de la cardiomyopathie septique

Il y a 40 ans, Parrillo décrivait l'existence d'une substance présente dans le sérum de patients septiques, dont la mise en commun avec des cardiomyocytes de rats était responsable d'une diminution de leur fraction de raccourcissement (85). Cette substance de nature indéterminée à l'époque a été dénommée par les auteurs le facteur dépresseur myocardique (FDM) (85). Les premiers FDM identifiés ont été les cytokines (notamment le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) (86). Leur taux

très élevé aux cours des premières 48 premières heures du sepsis étaient corrélés à la survenue de la défaillance cardiaque (87). Ces résultats ont été confirmés par la suite (86). Cependant, l'hypothèse selon laquelle les cytokines seraient les seules substances responsables de la dépression myocardique d'origine septique a été remise en question rapidement lorsqu'il a été démontré que la défaillance cardiaque persistait malgré une normalisation des taux de ces FDM après la 48^e heure de sepsis (85, 87, 88). Il a donc été suspecté d'autres substances responsables de la défaillance cardiaque (87). Leur nature, leur nombre et le mécanisme par lequel ces substances altèrent la fonction cardiaque ne sont que partiellement connus. De nombreux auteurs ont tenté d'identifier précisément les FDM (85, 86, 89–91). Malheureusement les données sont contradictoires en raison des caractéristiques hétérogènes (notamment du poids moléculaires (89, 90, 92), des conditions de solubilité (90, 92), du délai d'activité (90, 92, 93)) rendant leur étude et la définition de caractéristiques communes difficiles (94). Le tableau 3 regroupe de manière non exhaustive les principaux FDM impliqués au cours du sepsis connus à ce jour.

| Nom | Conditions d'expérimentation | Caractéristiques générales | Mécanisme(s) impliqué(s) | Références |
|-------------------------------|---|--|--|------------|
| TNFα | Sepsis expérimental et clinique Choc hémorragique expérimental (rat) | - Cytokine - 17 kDa, 185 acides aminés - impliqués dans l'apoptose, la nécrose et l'activation de la voie NF κ B | - Activité directe sur le cardiomyocyte par relargage de NO et d'espèces réactives de l'oxygène. - Activité de dépression myocardique via les récepteurs TLR4 et p55 dans le choc hémorragique. | (94, 95) |
| IL-6 | Sepsis clinique (méningococcémie) | -Cytokine pro-inflammatoire (phase initiale) -Action via l'activation de la voie JAK-STAT | - Dépression myocardique dose dépendante. - Arrêt de l'activité dépressive si épuration totale - Action directe sur les cellules via le récepteur gp130 | (94, 96) |
| MIF | Sepsis expérimental (injection de LPS chez la souris) | - Cytokine pro-inflammatoire exprimée de façon ubiquitaire dans de nombreux processus inflammatoires | - Amélioration de la fonction cardiaque si blocage par anticorps dans le choc septique induit par LPS chez la souris. - Mécanisme d'action inconnu (TNF α indépendant). | (97–99) |
| ADM | - Sepsis expérimental (LPS et CLP chez le rat) | - Peptide inotrope positif de 52 acides aminés, hyper produit par les cardiomyocytes ventriculaires - Responsable d'hyperperméabilité capillaire au cours du sepsis | -Voie adényl cyclase dépendante. -Altération de la voie du calcium du réticulum sarcoplasmique | (100, 101) |
| IL1β | Sepsis clinique (méningococcémie) | - Cytokine pro-inflammatoire - Principalement impliquée dans la réponse inflammatoire | - Dépression myocardique dose dépendante. - Arrêt de l'activité dépressive si épuration totale. - Mécanisme d'action inconnu. | (94) |
| NO | -Culture cellulaire | - Médiateur paracrine synthétisé principalement par les cellules endothéliales via la NO synthase. | - Second messenger dans la dépression myocardique induite par le TNF α (via NO synthase dépendante du calcium) | (102) |

Tableau 3: principaux facteurs dépresseurs myocardiques connus impliqués dans le sepsis

Les FDM semblent impliqués dans la dépression myocardique observée au cours du choc septique, hémorragique et de la brûlure (85, 86, 89–91). D'autres substances pourraient être cependant

incriminées. Des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer plus précisément la physiopathologie de la CS mais aussi dans le but de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques, dirigées vers les FDM.

3. Le système rénine angiotensine aldostérone

Le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) a été décrit il y a plus d'un siècle par Tigerstedt et Bergman (103). Nos connaissances sur ce système sont en constante progression. Le SRAA est l'un des principaux systèmes régulateur de l'homéostasie hydro-sodée et de la pression artérielle (103). De par son rôle majeur dans la vasoconstriction systémique, le SRAA a été le premier système neurohumoral à être étudié au cours l'IC (104). Aujourd'hui, les recommandations internationales sur la prise en charge de l'IC chronique mettent clairement les médicaments inhibiteurs du SRAA (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2) comme les thérapeutiques de première intention dans la prise en charge de l'IC chronique, soulignant le rôle prépondérant de ce système dans la physiopathologie de cette pathologie (13, 105, 106).

a. Physiologie générale du SRAA

La rénine est une aspartate protéase produite par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire de l'artériole afférente rénale (104). Elle provient du clivage de la prorénine (104). Lors d'une diminution de la pression artérielle, les barorécepteurs de la paroi des artérioles afférentes vont répondre en sécrétant de la rénine (107). La synthèse de la rénine est inhibée par de nombreux facteurs, notamment l'augmentation de la pression de perfusion rénale, de la pression artérielle systémique et de la volémie. La rénine clive l'angiotensinogène en angiotensine 1 (clivage de 10 acides aminés), elle-même clivée par l'enzyme de conversion (ACE) en angiotensine 2. A noter que la chymase est une protéase qui clive elle aussi l'angiotensine 1 en angiotensine 2 (108). Elle est la voie principale de synthèse de l'angiotensine 2 dans le cœur (109). Toute diminution de la pression artérielle systémique ou de la volémie va avoir comme principale conséquence une augmentation du taux d'angiotensine 2 circulant,

dont le rôle va être de rétablir une pression artérielle adéquate (action vasoconstrictrice directe et sécrétion d'aldostérone). La production d'angiotensine 2 est assurée au plan systémique mais aussi au plan local (notamment dans le tissu cardiaque (110, 111)). L'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ACE 2) est une carboxypeptidase dont la séquence peptidique est identique à celle de l'ACE (112). L'ACE2 génère de l'angiotensine (1-7) à partir de l'angiotensine 2, heptapeptide d'action vasodilatatrice (110). L'angiotensine (1-7) agit en se fixant sur les récepteurs *mas* mais dont les rôles précis ne sont pas clairement élucidés. (113).

Les angiotensines agissent via des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Le tableau 4 regroupe les différents récepteurs aux angiotensines ainsi que leurs effets lorsqu'ils sont activés (111, 114–120). Le récepteur de type 1 de l'angiotensine 2 (AT1) est le principal effecteur de l'angiotensine 2. Le récepteur de type 2 de l'angiotensine 2 (AT2) a des effets opposés en tous points à l'AT1 (121). Le récepteur de type 4 (AT4), spécifique de l'angiotensine 4, est impliquée dans la fonction tubulaire rénale et dans les phénomènes de mémorisation chez le rongeur (122). La rénine et la prorénine sont impliquées dans la synthèse d'angiotensine 1 et 2 (123, 124). Des travaux précliniques ont démontré qu'elles participent à la régulation de la pression artérielle (125). Leurs rôles précis chez l'humain restent cependant à définir. La figure 4 résume l'ensemble des enzymes et des récepteurs du SRAA (d'après (103)).

| Nom | Ligand(s) | Fonctions |
|--|--|--|
| Récepteur de type 1 de l'angiotensine 2 (AT1) | Angiotensine 2 Angiotensine 3 | Vasoconstriction, libération d'aldostérone, croissance cellulaire, inflammation, fibrose |
| Récepteur de type 2 de l'angiotensine 2 (AT2) | Angiotensine 3 | Antagonisme des effets de l'AT1, apoptose, neuroprotection, inflammation |
| Récepteur de l'angiotensine 4 | Angiotensine 4 Leu-Val-Val-hémorphine 7 | Vasodilatation, baisse du transport tubulaire du sodium, inflammation |
| Récepteur de la rénine/prorénine | Rénine Prorénine | Augmentation de la synthèse d'angiotensine, fibrose |
| Récepteur <i>mas</i> oncogène | Angiotensine (1-7) | Antagonisme des effets de l'AT1, antidiurétique, inhibition de la croissance cellulaire |

Tableau 4 : récepteurs cellulaires du SRAA

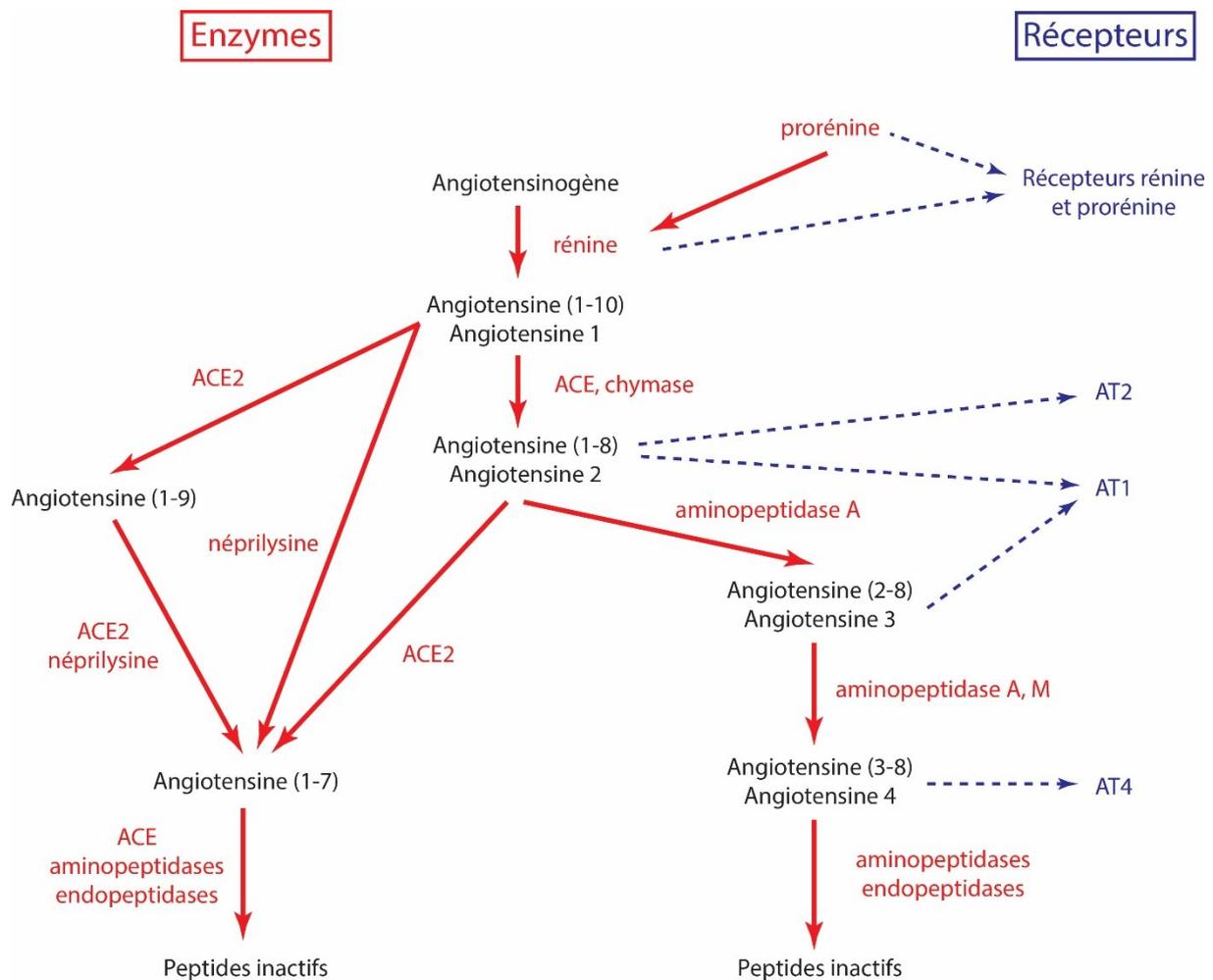


Figure 4: vue générale du système rénine angiotensine aldostérone

b. Rôles du SRAA au cours de l'IC

Le SRAA est historiquement le premier système neuro-hormonal à avoir été étudié au cours de l'IC (104). Au cours l'HF_rEF où la contractilité myocardique est réduite, la baisse de pression artérielle secondaire à une réduction du débit cardiaque est détectée par les barorécepteurs carotidiens et aortiques (126). Ces récepteurs vont activer une série de mécanismes visant à compenser cette baisse de pression et de débit, en adaptant notamment la fréquence cardiaque, la contractilité myocardique, la rétention hydro-sodée rénale, et l'état de constriction des vaisseaux sanguins (126), dans le but d'assurer une perfusion tissulaire minimale (127). Ces mécanismes compensateurs sont activés via le système nerveux sympathique et le SRAA, et forment la réponse neuro-hormonale (126). Ces mécanismes et leurs effets

sont représentés dans la figure 5 (126). L'activation rapide de ces mécanismes va permettre la libération de médiateurs vasoconstricteurs telles que l'angiotensine 2 (dont les rôles ont été décrits plus haut), la vasopressine mais aussi de nombreux neurotransmetteurs adrénergique dans la circulation systémique et locale, notamment cardiaque (104, 126, 128). L'activation de ces systèmes va perdurer tant que la cause de l'IC persiste, ceci ayant comme conséquence l'apparition d'effets délétères (hypertrophie et nécrose cardiomyocytaire (129–131), fibrose cardiaque, arythmies, baisse du flux sanguin rénal, altération de la réponse aux peptides natriurétiques, hypertrophie vasculaire, etc (126)).

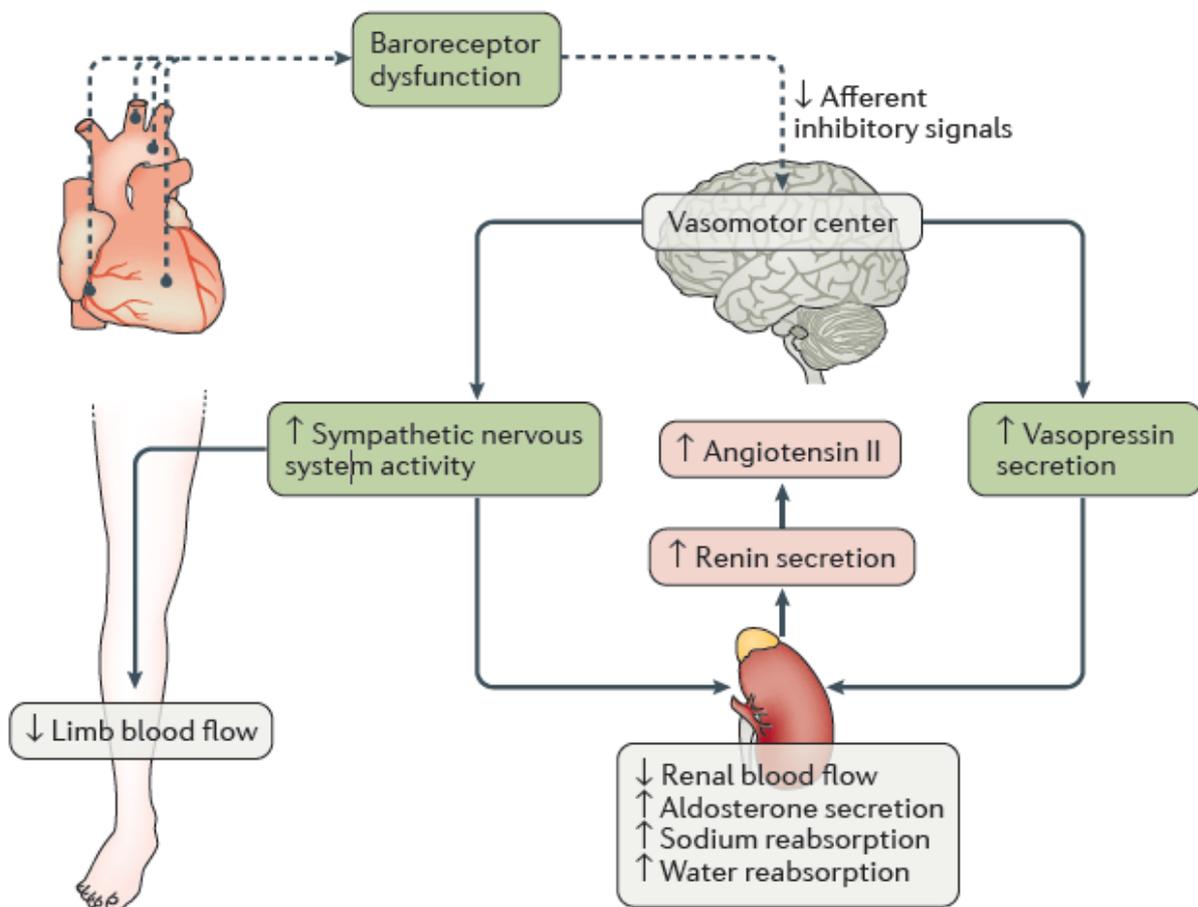


Figure 5 : schéma représentatif des mécanismes neuro-hormonaux activés lors de l'IC.

L'activation du SRAA représente une étape clé dans la physiopathologie de l'IC chronique en permettant de contrecarrer les effets systémiques et régionaux d'une baisse de la contractilité myocardique (127) et d'assurer ainsi une perfusion tissulaire optimale, au moins dans les premiers temps de la maladie (126,

127). Le SRAA a été peu étudié au cours de l'IC aiguë. Ainsi les rôles exacts de certains acteurs du SRAA au cours de l'IC aiguë ne sont pas connus.

c. SRAA et sepsis

Le SRAA est un système majeur impliqué dans le maintien de la volémie et de la pression artérielle. Le SRAA est activé au cours du sepsis pour assurer le maintien de la volémie et le tonus vasculaire (132, 133). Bien qu'il ait été initialement décrit dans le plasma, le SRAA n'est pas limité uniquement à la circulation systémique, plusieurs de ses composants étant synthétisés et activés dans d'autres organes (notamment le cerveau, les vaisseaux, les glandes surrénaliennes, le tissu adipeux, les reins et le cœur) (134). Le rôle du SRAA au cours du sepsis n'a été que peu étudié. Mais il est clairement démontré que le SRAA est activé au cours du sepsis pour essayer de maintenir un tonus vasomoteur (135–139). En cas d'activation prolongée, le SRAA peut avoir des conséquences cliniques délétères (vasoconstriction intense, ischémie, insuffisance rénale aiguë (133)) de même qu'en cas de sous activation (choc réfractaire (140), dysfonctions d'organes multiples (136, 141)).

En réponse à la défaillance cardio-circulatoire d'origine septique, le SRAA va être activé en même temps que l'axe hypothalamo-hypophysaire, que les glandes surrénales et que le système nerveux sympathique dans le but d'assurer la perfusion des organes minimale (137, 138, 142–144).

Un excès de formation de monoxyde d'azote (NO) est un des principaux mécanismes potentiellement responsable de la dysfonction vasculaire et de la vasoplégie observées au cours du sepsis, la NO synthase (responsable de la formation du NO) étant stimulée par les cytokines pro-inflammatoires en réponse à une infection (145). D'autres mécanismes sont impliqués dans cette vasoplégie septique puisque l'inhibition de la NO synthase au cours du sepsis ne permet pas de lutter entièrement contre l'hyporéactivité vasculaire aux catécholamines (146). Dans ce contexte, l'hypothèse d'une dysfonction du SRAA au cours du sepsis pouvant expliquer en partie la vasoplégie septique a été soulevée (134). Cependant, les taux tissulaires et plasmatiques d'angiotensine 2 sont augmentés au cours du sepsis (136, 147) mais ses effets biologiques sont réduits à cause d'une inhibition de ses récepteurs induite par niveaux élevés de cytokines et de NO (136, 137, 147). De plus, la sécrétion de catécholamines

normalement induite par l'angiotensine 2 est réduite à cause d'une diminution du nombre de récepteurs disponibles à l'angiotensine 2 au niveau du cortex surrénalien (148).

Les enzymes de conversion de l'angiotensine 1 et 2 sont impliquées dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale d'origine septique (136). Les taux tissulaires d'angiotensine 2 dans le cœur et dans l'aorte sont augmentés à la phase initiale et tardive du choc septique (149). De plus, ces facteurs semblent être impliqués dans la dépression myocardique du sepsis induite par injection de LPS via une action synergique avec le NO, responsables alors d'un déséquilibre de l'homéostasie calcique intracellulaire et une dysfonction mitochondriale (150). Il est aussi important de noter que l'angiotensine 2 augmente la perméabilité micro vasculaire participant ainsi au phénomène de fuite capillaire observé au cours du sepsis (151). Enfin, l'excès de stimulation du SRAA, comme il peut être observé au cours du sepsis, peut être responsable d'une vasoconstriction excessive, de thromboses micro vasculaires et d'un état inflammatoire important (152), comme décrits plus haut.

En conclusion, le SRAA est impliqué dans la physiopathologie et dans les conséquences systémiques du sepsis. Sa modulation, en agissant sur les différents acteurs, pourrait permettre de limiter les défaillances d'organes, notamment cardiaques et endothéliales, d'origine septique.

4. Les enképhalines

a. Généralités

En 1975, Kosterlitz et al. ont décrit une substance endogène semblable à la morphine qui interagissait directement avec les récepteurs morphiniques : l'enképhaline (littéralement « in the head ») (153). En parallèle, Hughes purifiait la Met-enképhaline et la Leu-enképhaline, deux pentapeptides provenant du broyat de cerveaux porcins (154). Par la suite, de nombreuses enképhalines et leurs récepteurs ont été purifiés (155), notamment au niveau du système nerveux central (médulla des glandes surrénales, le noyau du tractus solitaire, le noyau dorsal du nerf vague, et le nucleus ambiguus) et périphérique (neurones sympathiques et parasympathiques) ainsi que dans le cœur, dans la rate, dans l'estomac, dans les intestins, dans le pancréas et dans le foie (156, 157). La caractéristique des enképhalines est leur demi-vie très courte (de l'ordre de la minute) (158). Les enképhalines sont des pentapeptides présentes chez tous les mammifères avec une chaîne aromatique en position 4 essentielle à leur activité (158), (figure 6).

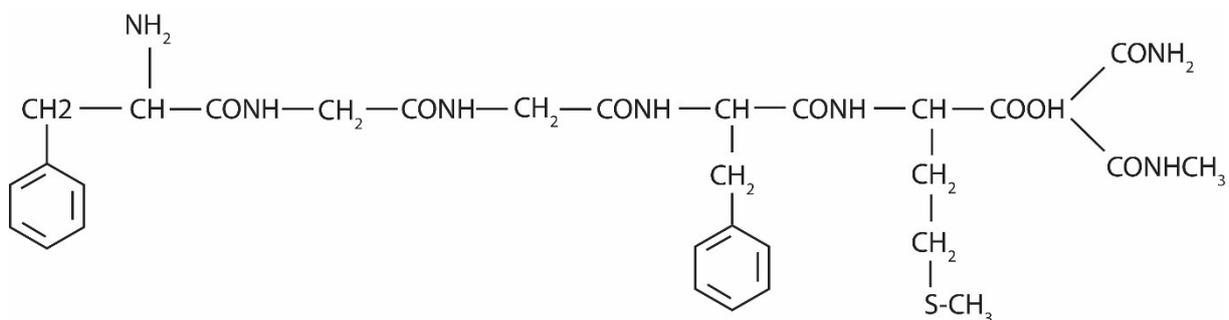


Figure 6 : structure de la Met-enképhaline

Trois gènes codent pour les peptides opioïdes et apparentés : celui codant pour la pro-opiomélanocortine, la prodynorphine et la proenképhaline, précurseurs respectifs des endorphines, des dynorphines et des enképhalines (159, 160). Ces précurseurs sont tous présents dans le cœur et agissent sur les récepteurs κ -, μ - et δ - des opioïdes (155). Bien que les rôles neuronaux des peptides opioïdes soient largement décrits dans la littérature (notamment leur effets sur la respiration, le sommeil, la

fonction immunitaire, la régulation neuro-endocrine, la régulation thermique, l'attention, la mémoire, le stress etc...(161–165)) leur rôle précis sur la fonction cardiovasculaire n'a été que très peu étudiée.

b. Les enképhalines et la fonction myocardique

Les enképhalines jouent un rôle important dans la physiologie cardiovasculaire car elles agissent directement sur le système nerveux central et périphérique (166). Lorsqu'ils se fixent à leurs récepteurs, les peptides opioïdes peuvent altérer la fonction myocardique par des effets directs sur la fréquence cardiaque (tachycardie ou bradycardie) et sur la pression artérielle (hypotension ou hypertension). Ces effets peuvent varier en fonction de l'espèce étudiée, de la dose de peptide utilisée et du site d'administration (167, 168). Le tableau 5 reprend l'ensemble des effets cardiovasculaires des peptides opioïdes (155).

| Type de récepteurs aux opioïdes | Site d'action centrale | Site d'action systémique |
|---------------------------------|--|---|
| μ | <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension • Bradycardie | <ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation • Bradycardie • Augmentation débit sanguin cérébral |
| δ | <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension, bradycardie (moëlle, tronc cérébral, 3^e ventricule) • Hypertension et tachycardie (noyau tractus solitaire) | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibition du relargage de noradrénaline • Vasoconstriction • Hypotension • Bradycardie |
| κ | <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension artérielle • Hypertension artérielle | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibition du relargage de noradrénaline • Vasoconstriction • Hypotension artérielle • Bradycardie |

Tableau 5: effets cardiovasculaires de la stimulation centrale et périphérique des récepteurs aux opioïdes

Les effets cardiovasculaires des enképhalines sont différents selon leur site d'administration (central ou périphérique) faussement attribuées initialement à la faible pénétration de ces peptides dans les centres cardiovasculaires du cerveau (169). Par exemple, Feuerstein a démontré les effets presseurs et

dépresseurs des [D-Ala², D-Leu⁵]-enképhalines sur les récepteurs μ cérébraux selon leur site d'administration (169).

c. La production endogène cardiaque des enképhalines

Les enképhalines sont synthétisées et libérées dans le système nerveux central et périphérique (158). Dans le cœur, elles sont co-localisées avec les catécholamines au niveau de l'extrémité terminale des neurones (156). La majeure partie des enképhalines cardiaques semblent directement produite par les cardiomyocytes (170, 171). La transcription myocardique du gène de la proenképhaline code pour un polypeptide de 31 kDa qui va subir des modifications post-transcriptionnelles et donnera naissance à la Met-enképhaline, à la Leu-enképhaline, à la Met⁵-enképhaline-Arg⁶-Phe⁷ (MEAP), à la Met-enképhaline-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, aux analogues de amidorphine et de la metorphamide, et à d'autres peptides (notamment les peptides B, E, F, I et BAMP20)(figure 7) (159, 172, 173)).

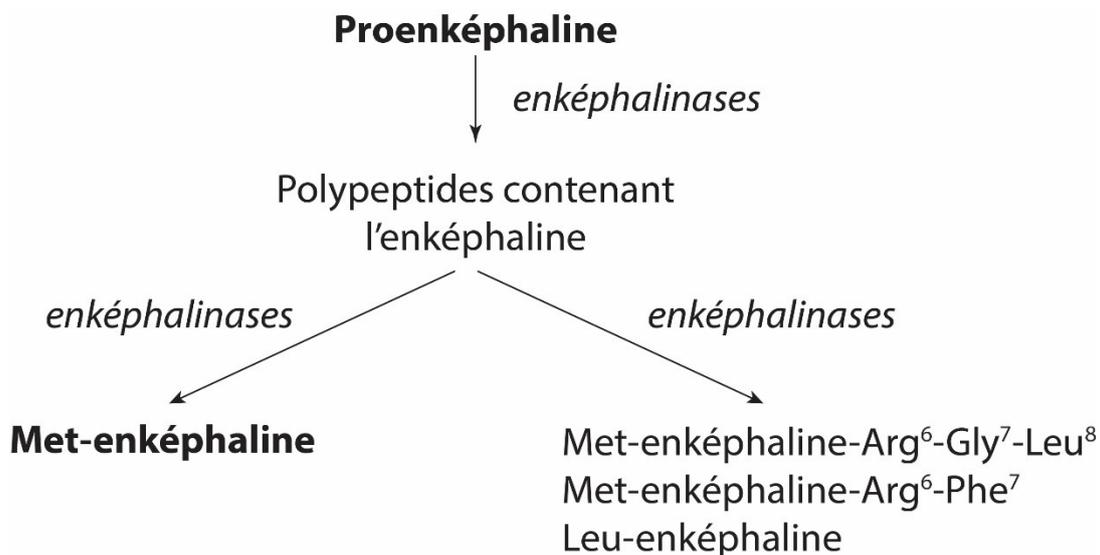


Figure 7 : schéma de la voie de production des enképhalines depuis la proenképhaline.

Bien que les niveaux de transcription d'ARN messagers codant pour la proenképhaline soient plus élevés dans le cœur que dans le cerveau, suggérant un potentiel de synthèse des opioïdes plus important dans le cœur, la quantité d'extraits de peptides dérivés de la proenképhaline est plus basse dans ce dernier

(173, 174). Ceci peut en partie être expliqué par le fait que ces peptides ne sont pas stockés dans le cœur, mais rapidement excrétés puis dégradés par les enképhalines. En 2000, Younes et al. démontraient que 95% des enképhalines localisés dans cœur de rat étaient stockés sous forme de précurseurs (20%), de peptide B (43%) et de MEAP (32%) (172). Au sein même du cœur, des disparités de transcription d'ARN messager et d'expression protéique existent. Ainsi, Weil et al. a démontré que les niveaux de transcription d'ARN messager de la proenképhaline étaient quatre fois supérieurs dans le ventricule gauche que dans le ventricule droit chez le rat, possiblement lié au fait d'une expression sélective du gène (175). Enfin, le relargage des enképhalines est fonction des événements myocardiques. Dans ce sens, un travail démontrait en 2001 que le taux de Leu-enképhaline mesuré dans le sinus coronaire était augmenté en cas d'ischémie reperfusion chez le rat (176).

Le cœur est un organe endocrine complexe et dont la fonction myocardique est influencée par la sécrétion autocrine et paracrine des enképhalines.

d. Les récepteurs aux peptides opioïdes

Dans le cerveau, les récepteurs aux opioïdes sont concentrés dans le tronc cérébral et dans l'hypothalamus, à proximité des centres cardiovasculaires (177). Dans le cœur, 3 types de récepteurs aux peptides opioïdes ont été identifiés : κ , μ et δ . Le tableau 6 regroupe les trois sous types de récepteurs aux opioïdes avec leurs agonistes et antagonistes connus à ce jour.

| Type | Agonistes naturels | Agonistes synthétiques | Antagonistes |
|----------|--|---|--|
| μ | <ul style="list-style-type: none"> Beta-endorphine Met-enképhaline Endomorphine 1 Endomorphine 2 | <ul style="list-style-type: none"> Morphine Morphiceptine Sufentanil D-enképhaline Etonitazene | <ul style="list-style-type: none"> Naloxone Naloxozone Naloxonazine Naltrexone |
| δ | <ul style="list-style-type: none"> Leu-enképhaline Met-enképhaline | <ul style="list-style-type: none"> D-enképhaline Deltorphine I et II | <ul style="list-style-type: none"> Nalozone Naltrindole |
| κ | <ul style="list-style-type: none"> Dynorphine | <ul style="list-style-type: none"> Ethyl-ketocyclazocine Enadoline | <ul style="list-style-type: none"> Mr1452 Mr2266 UPHIT DIPPA |

Tableau 6 : agonistes et antagonistes des principaux récepteurs aux opioïdes

La localisation précise des récepteurs aux opioïdes et leur quantité restent cependant indéterminées. Bell et al. ont rapporté dans une étude chez l'Homme que le récepteur δ était le sous-type prédominant au niveau du myocarde de l'atrium et du ventricule, suivi par le sous-type μ (178), contrastant avec de nombreuses études précédentes qui décrivaient que les sous-groupes κ et δ étaient majoritaires chez l'adulte (179–184). Une autre étude, chez l'animal cependant, rapportait la présence des sous-groupes κ et δ chez l'adulte, alors que les sous-groupes κ et μ étaient les seuls en période post-natale immédiate (183). D'après ces observations, Wittert concluait à la prédominance du sous-groupe δ chez le rat adulte (166, 178). Les enképhalines et les catécholamines sont présentes au niveau du sarcolemme du cardiomyocyte (155). Dans le cœur, les récepteurs aux opioïdes sont co-localisés avec les récepteurs β adrénergiques (185). La libération des peptides opioïdes va donc avoir des conséquences sur les résistances systémiques vasculaires, la contractilité et la fréquence cardiaque (155). En 2000, Pepe et al démontrait que l'injection de 10^{-8} M de Leu-enképhaline dans un cœur isolé de rat inhibait l'augmentation de la pression systolique du ventricule gauche suite à l'injection de noradrénaline (185). Une étude des mêmes auteurs démontrait que l'injection de la même enképhaline était responsable d'une suppression du courant Ca^{2+} de type L, de la transitoire calcique et de la contraction myocardique ventriculaire chez le rat (186). Tous ces effets étaient abolis par l'injection de naloxone, un peptide antagoniste des récepteurs aux peptides opioïdes (186). La figure 8 schématise l'interaction complexe qui existe entre les récepteurs aux opioïdes et les récepteurs β adrénergiques (187).

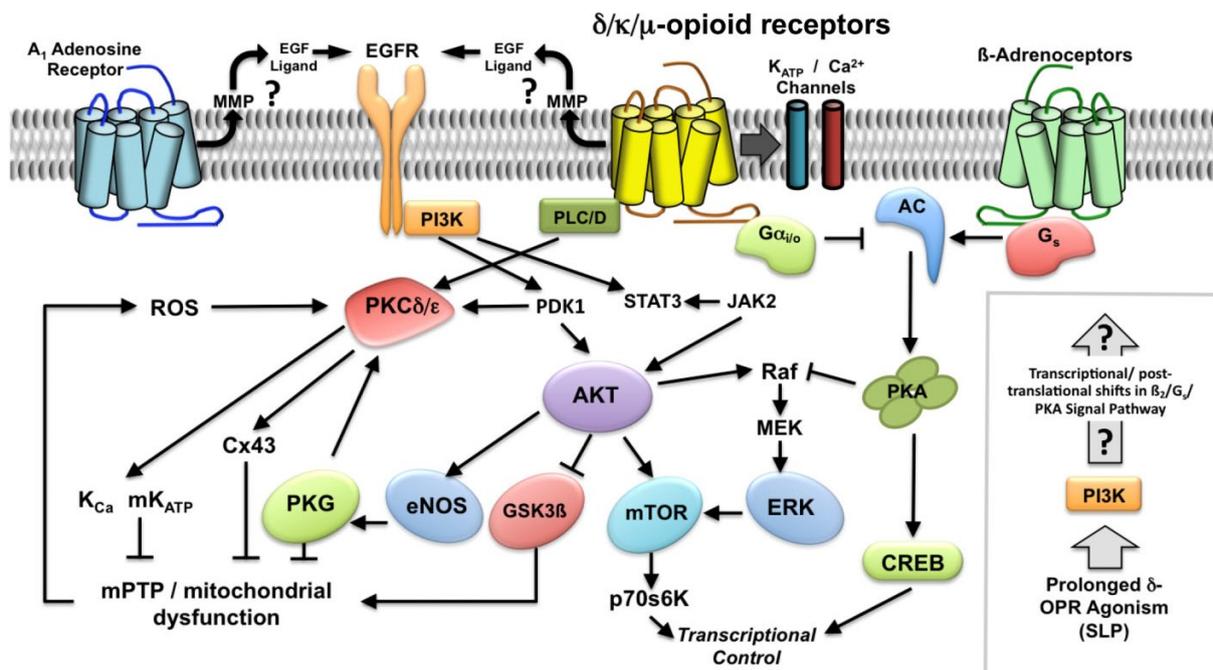


Figure 8: voies de signalisation intracellulaire commune aux récepteurs opioïdes et aux récepteurs β adrénergiques.

e. Voies de signalisation intracellulaire cardiaque des enképhalines

Les récepteurs aux opioïdes appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (188). Ces récepteurs partagent une structure commune faite de 7 domaines transmembranaires, traversant la membrane cellulaire sous forme d'hélices (189). Plus de 800 récepteurs couplés à des protéines G sont aujourd'hui connus dans l'espèce humaine, regroupés en 5 grandes familles et sous familles selon leur séquence d'acides aminés (190). Ces récepteurs sont impliqués dans un très grand nombre de processus physiologiques (cardiovasculaires, endocriniens, vision etc...). Ils sont une cible thérapeutique d'intérêt dans un grand nombre de pathologies (191, 192). Après la liaison à leur ligand, les récepteurs couplés aux protéines G vont subir des modifications conformationnelles, permettant leur contact avec la protéine G qui devient active (protéine liant les nucléotides guanyliques), et qui va à son tour moduler l'activité d'une enzyme ou d'un canal ionique (193), (figure 9).

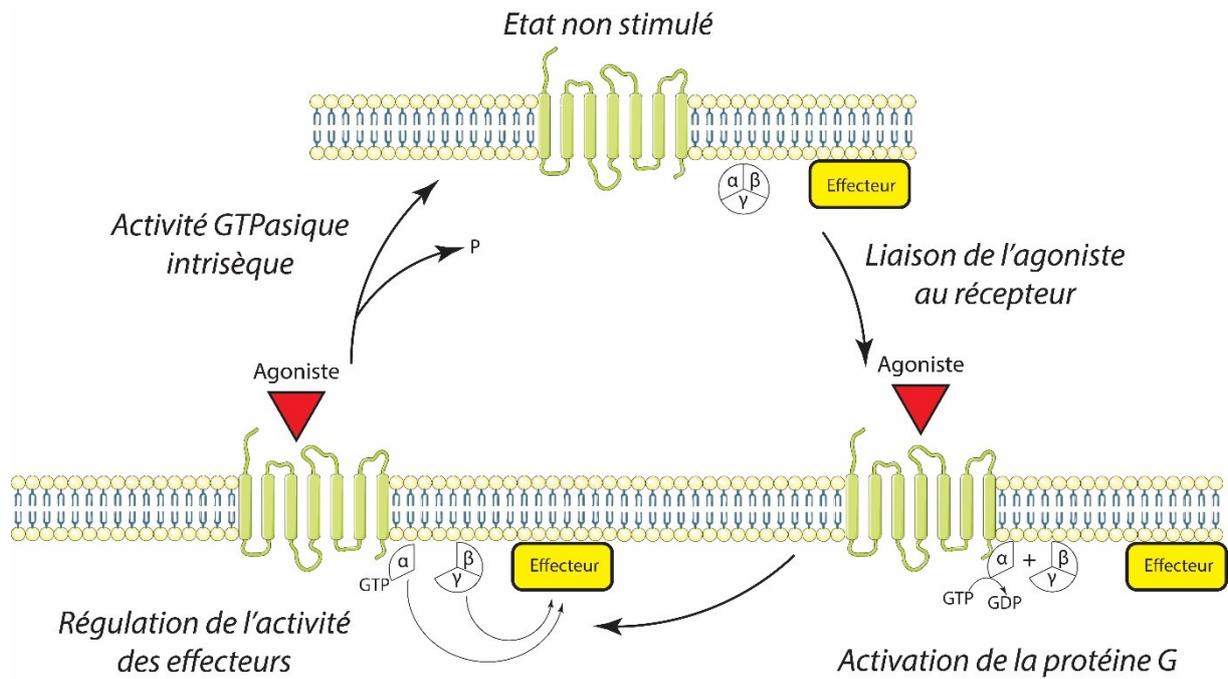


Figure 9 : schéma récapitulatif du cycle d'activation et de désactivation du récepteur couplé aux protéines G lors de la liaison avec son agoniste.

Dans le cœur, lorsqu'ils sont activés, les récepteurs couplés aux protéines G ayant comme ligand les enképhalines vont inhiber l'adénylate cyclase, qui va alors diminuer la production d'AMP cyclique (194) et les réserves de calcium intracellulaires cardiaque (195) (effet inotrope négatif). L'inositol (1, 4,5) triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol générés au cours de cette cascade d'activation du récepteur deviennent les substrats de la protéine kinase C (figure 10). Onze formes différentes de protéine kinase C ont été décrites dans le cœur. L'activation et la translocation d'iso formes de protéine kinase C dans la mitochondrie suivies d'une ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K⁺_{ATP}) semblent être la principale voie de signalisation impliquée dans le pré conditionnement ischémique myocardique (196, 197).

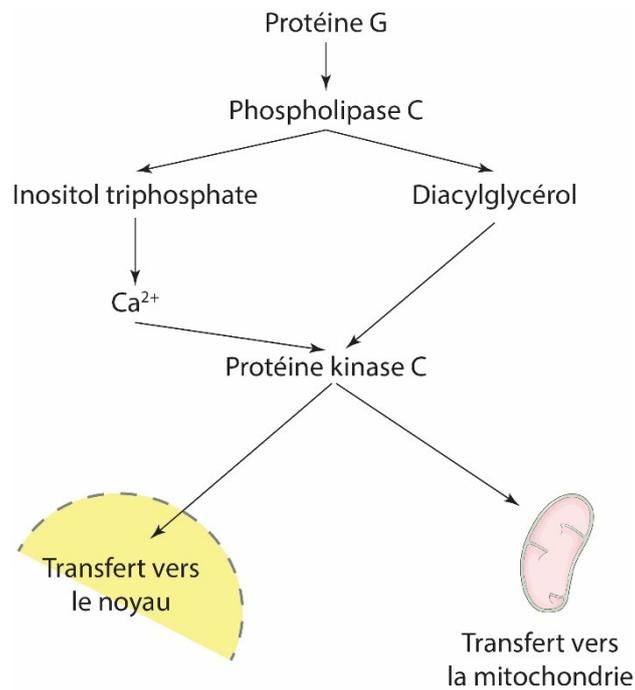


Figure 10 : voie de signalisation cellulaire suivant l'activation du récepteur couplé aux protéines G par les enképhalines

f. Enképhalines et insuffisance cardiaque

Le système nerveux sympathique est un des systèmes majeurs de la régulation du système cardiovasculaire (198). Au cours de l'IC, en réponse à une baisse du débit cardiaque et de la pression artérielle, le système nerveux sympathique est activé et permet une augmentation des résistances vasculaires systémiques, de l'inotropisme et de la fréquence cardiaque (126). Cette réponse neuronale est majeure, précoce et vise à compenser la baisse de débit et de pression induite par la dépression myocardique observée au cours de certains types d'IC (126). Cependant, lorsque la défaillance cardiaque persiste, l'augmentation des résistances, de l'inotropisme et de la fréquence cardiaque peut induire une augmentation du travail myocardique rendant ce mécanisme de compensation, initialement adapté et bénéfique, alors délétère à long terme (199).

Comme vu plus haut, les enképhalines ont une action opposée à celles des catécholamines suite à une stimulation neuronale cardiaque, notamment en ayant des effets inotropes négatifs responsable alors d'une dysfonction contractile et d'une baisse de la réponse à la stimulation sympathique. De manière intéressante, il a été démontré que les taux de Met-enképhaline étaient augmentés au cours de l'IC chronique, et que ces taux étaient corrélés au degré de sévérité de la maladie (200–202). Himura et al. ont démontré que l'injection de naloxone, un antagoniste des récepteurs aux opioïdes, améliorait l'hémodynamique et la fonction cardiaque chez des chiens conscients dans un modèle d'IC congestive (203). Toujours dans ce même modèle, une augmentation rapide des doses d'un antagoniste des récepteurs δ s'accompagnait d'une augmentation de la contractilité myocardique (202). A l'opposé, une étude de Llobel en 1997 décrivait des effets dépresseurs de la naloxone et de la naltrindole, un antagoniste spécifique des récepteurs δ aux opioïdes, dans les oreillettes droites de cœurs humains sains ou atteints d'IC (204).

En conclusion, les enképhalines semblent jouer un rôle central au cours de la dysfonction myocardique de l'IC. Une meilleure compréhension de leur implication dans les maladies cardiovasculaires est indispensable car elles représentent des cibles thérapeutiques potentielles de l'IC.

5. Les enképhalines

a. Généralités sur les enképhalines

Les enképhalines forment un groupe hétérogène d'enzymes qui clivent les peptides opioïdes. Le site de clivage des enképhalines dépend de la séquence des acides aminés de l'enképhaline à cliver (figure 11) (205).

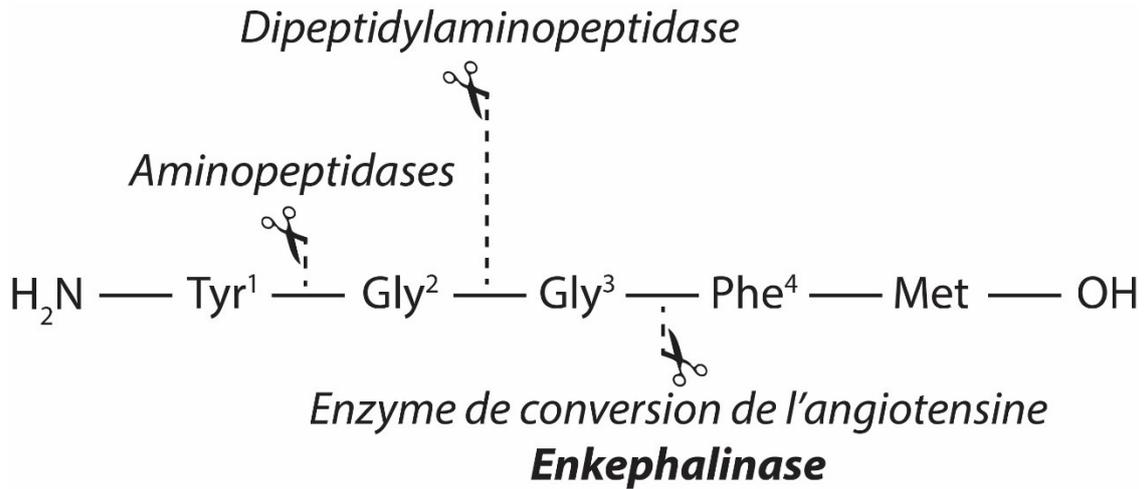


Figure 11 : sites de clivage des enképhalines en fonction des enzymes

Quatre groupes d'enképhalines ont été décrits. Leur classification est fonction des éléments composants le site catalytique de l'enzyme (205). Elle comprend :

- les métallo-peptidases (ou métalloprotéinases)
- le sérine-peptidases
- les carboxypeptidases
- les thiolpeptidases

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons exclusivement aux dipeptidyl-peptidases appartenant au groupe des métallo-peptidases.

b. Les dipeptidyl peptidases (DPP)

Huit DPP ont été décrits à ce jour. Le tableau 7 regroupe les DPP avec leurs principales caractéristiques connues à ce jour (206).

| | Classe peptidique | Localisation cellulaire | Activité | Rôles physiologiques | Références |
|--------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|------------|
| DPP1 | Cystéine peptidase | Lysosome | Exopeptidase Endopeptidase | - Activation des sérines peptidase - Réponse immunitaire - Hydrolyse d'oligopeptides | 125 |
| DPP2 | Sérine peptidase | Lysosome | Dipeptidyl aminopeptidase | - Hydrolyse d'oligopeptides | 126 |
| DPP3 | Métallo-peptidase | Cytoplasme | Dipeptidyl aminopeptidase | - Turnover protéique - Nociception - Stress oxydant - Régulation pression artérielle | 19 |
| DPP4 | Sérine peptidase | Membrane | Dipeptidyl aminopeptidase | - Réponse T cellulaire - Interaction hôte-pathogène - Dégradation matrice extracellulaire | 127 |
| DPP6 | Sérine peptidase | Cytoplasme Membrane Noyau | Dipeptidyl aminopeptidase | - Modulation de KCND2 (canal K ⁺ cardiaque) | 128 |
| DPP8 | Sérine peptidase | Cytoplasme | Dipeptidyl aminopeptidase | - Réponse immunitaire | 129 |
| DPP9 | Sérine peptidase | Cytoplasme Membrane | Dipeptidyl aminopeptidase | - Hydrolyse protéique | 130 |
| DPP10 | Sérine peptidase | Membrane | Protéolyse | - NA | 131 |

Tableau 7 : caractéristiques des différentes dipeptidyl peptidases chez les mammifères

c. La dipeptidyl peptidase-3 (DPP3)

i. Généralités

La DPP3 (aussi appelée enképhalinase B (207), angiotensinase des globules rouges (208), dipeptidyl aminopeptidase III (207) et dipeptidyl arylamidase III (209)), appartient à la famille des métallo-peptidases (210). Elle fait partie du système protéolytique (dégradome) des mammifères. Historiquement, les métallo-peptidases étaient uniquement connues pour jouer un rôle dans le stade terminal de la dégradation des protéines (206). Par la suite, il a été décrit de nombreux rôles de ces peptidases à différentes étapes du processus de dégradation des peptides (211–214), de la régulation du cycle cellulaire (215), de la maturation protéique (216), du processus infectieux d'origine virale (217) et de la défense contre le stress oxydant (218). L'intérêt des scientifiques pour les métallo-peptidases est grandissant car elles jouent un rôle clé dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.

La DPP3 (DPPIII, EC 3.4.14.4) est historiquement la troisième dipeptidyl peptidase à avoir été découverte (206). Elle a été purifiée pour la première fois en 1967 à partir de broyats de cerveaux bovins (209). Depuis, elle a été purifiée depuis de nombreux autres tissus et organismes vivants : érythrocytes humains (208, 219), polynucléaires neutrophiles (220), monocytes et lymphocytes (221), placenta (222), muscle (223), peau (224), liquide céphalo-rachidien (221), cristallin (225, 226), cellules de neuroblastome (218), chez le rat (foie (227), peau (224) et cerveau (207, 228)), chez le porc (muscle squelettique et rate porcins (229)), érythrocytes de lapin (230), cerveau de singe et de chèvre (231–233), *Echis coloratus venom* (234), *Drosophila melanogaster* (235), *Blaberus craniifer* (236), *Dictyostelium discoideum* (237), *S. cerevisiae* (238), *Schistosomes* (239), *Leishmania major* (235), et *Entamoeba histolytica* (240).

ii. La DPP3 est caractérisée par son site catalytique HEXXGH

Les membres de la grande famille des métallopeptidases sont caractérisés par la présence du site catalytique HEXXGH (His-Glu-Leu-Leu-X-X-Gly-His) (241). Présentant un motif unique, la DPP3 a été classée dans la famille M49. Les deux résidus His présents au niveau de son site catalytique fixent un ion divalent (principalement ion Zn^{2+}) (206).

iii. Localisation cellulaire

La DPP3 a été décrite initialement comme une peptidase de localisation cytosolique (208, 222). L'absence de peptide signal dans la structure primaire de la DPP3 humaine (hDPP3) va dans ce sens (242). Cependant, quelques études ont prouvé que la DPP3 avait aussi une activité membranaire chez les mammifères (207, 220, 231, 243). Les mécanismes exacts impliqués dans l'adressage de l'enzyme à la membrane sont à ce jour inconnus (243). Quelques travaux supposent que des modifications post-translationnelles des protéines adressées à la membrane et indépendantes du complexe réticulum endoplasmique – système de Golgi peuvent adresser certaines protéines à la membrane (244–246), notamment par des mécanismes de myristoylation (242) et de phosphorylation (247). Ces sites sont présents dans la structure de la DPP3 (206). Enfin, la DPP3 a été identifiée dans certains secteurs extracellulaires, notamment le placenta, le plasma séminal et le liquide céphalo-rachidien (221, 222, 248). Bien que le mécanisme par lequel la DPP3 est présente dans ces secteurs demeure inexpliqué, l'hypothèse d'un relargage de l'enzyme lors d'une mort cellulaire est l'hypothèse la plus probable (249).

iv. Mécanismes d'action de la DPP3

La DPP3 clive le dipeptide de l'extrémité N terminale des oligopeptides selon un mécanisme catalytique proche de celui de la thermolysine et de la néprilysine, bien qu'elles ne présentent pas de similarités structurelles entre elles (250). La liaison entre la DPP3 et son substrat est déterminée par deux facteurs importants :

- **L'orientation** : c'est l'extrémité C-terminale du ligand qui doit pénétrer à l'intérieur du site catalytique, et l'extrémité N-terminale du ligand doit être exposée à l'extérieure.
- **La proximité** : pour que la réaction catalytique puisse se faire, l'extrémité N-terminale du ligand doit se trouver à une distance de 6-7 Å de l'ion métallique central.

La spécificité d'une peptidase vis-à-vis de son substrat est déterminée par les caractéristiques de la séquence d'acides aminés de ce dernier à proximité de la zone de clivage (250). Cependant, aucune caractéristique du genre n'a été retrouvée chez la DPP3. Ainsi, la DPP3 est capable d'hydrolyser tous types de résidus (aromatiques, hydrophobes, basiques, etc) (206). Un large site catalytique associé à une flexibilité conformationnelle de l'enzyme permet une adaptation de la DPP3 à son substrat, quelle que soit sa longueur et sa composition. La DPP3 présente donc une activité peptidase non spécifique (206). Les peptides d'une longueur supérieure à 10 acides aminés ou inférieure à 3 acides aminés ne sont pas clivés par la DPP3 (251). Bien que les raisons exactes ne soient pas élucidées, l'hypothèse de la présence d'une angulation particulière formée par un triplé d'arginine dans ce type de peptide (> 8 acides aminés) rendrait l'adaptation de l'enzyme à son substrat difficile (206).

v. *Propriétés physico-chimiques de la DPP3*

a. *Substrats*

Comme cité plus haut, la DPP3 est une exo-aminopeptidase, clivant l'extrémité N-terminale des peptides de 3 à 10 acides aminés (207, 209). Les substrats de DPP3 connus à ce jour sont résumés dans le tableau 5.

| Substrats | Reference |
|---|----------------------|
| Angiotensines <ul style="list-style-type: none"> • Ang II • Ang III • Ang IV | (208, 231) |
| Proctoline | (252) |
| Enképhalines <ul style="list-style-type: none"> • Leu-enképhaline • Met-enképhaline | (253) |
| Endorphine <ul style="list-style-type: none"> • Endomorphine 1 • Endomorphine 2 | (254) |
| β-casomorphine humaines | (254) |
| Dérivés dipeptidiques <ul style="list-style-type: none"> • Arg-Arg-βNA • Arg-Arg-MNA • Arg-Arg-NH-Mec • ArgAla/Leu-Arg-NH Nap | (207, 209, 227, 231) |

Tableau 8 : principaux substrats de la DPP3

Seuls les peptides comprenant 3 à 10 acides aminés sont clivés par la DPP3 (207, 209). Les tétra et décapeptides semblent être les meilleurs substrats pour la DPP3, sans que la nature de l'extrémité C terminale du peptide n'affecte l'efficacité catalytique de la peptidase (209). L'Arg-Arg- β -naphthylamide ($K_m = 7.7 \mu\text{M}$) est le substrat utilisé en routine pour mesurer l'activité de la DPP3 (220, 255).

b. Activateurs de la DPP3

L'ion métallique divalent, plus rarement monovalent, du site catalytique est essentiel à l'activité des métallopeptidases. L'ion Zn^{2+} est le plus fréquemment retrouvé (206). De nombreuses études ont confirmé le rôle du Zn^{2+} dans l'activité catalytique de la peptidase avec un rapport 1 : 1 (un ion Zn^{2+} pour chaque protéine DPP3) (256). Cependant, lorsque la concentration de Zn^{2+} dépasse une certaine limite, l'activité de la peptidase est inhibée. L'activité de DPP3 chez le rat et *D. melanogaster* est complètement inhibée par 10 μM et 7 mM de Zn^{2+} respectivement (256, 257). D'autres ions divalents peuvent participer à l'activité de la peptidase. Ils sont par ordre de fréquence : Co^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} et Ba^{2+} (248). Tous peuvent restaurer l'activité de la DPP3 inhibée par le l'EDTA.

c. Rôles physiopathologiques de DPP3

i. DPP3 est impliquée dans le renouvellement protéique cellulaire

Les protéines cellulaires destinées à être éliminées sont dégradées dans le système ubiquitine protéasome (206, 258). Les peptides alors obtenus à la sortie du système, dont la taille varie de 3 à 24 acides aminés sont libérés dans le cytosol (259) formant un pool de peptides disponibles pour la cellule : le peptidome (206). Les peptides issus du peptidome peuvent être hydrolysés par les endoaminopeptidases et exoaminopeptidases en acides aminés et sont utilisés soit pour la synthèse de nouvelles protéines soit pour la synthèse énergétique (206). Les peptides de plus de 16 acides aminés sont dégradés par la tripeptidyl peptidase II (TPPII) alors que les peptides comprenant 6 à 17 acides aminés sont dégradés par la thimet oligopeptidase (TOP). Les peptides issus du clivage de ces enzymes sont dégradés en acides aminés par l'action conjuguée d'aminopeptidases telles que l'aminopeptidase B, l'hydrolase aminopeptidase leucotriène A₄ (260), l'hydrolase bléomycine (261) et l'aminopeptidase puromycine sensible (215). La DPP3 participe au renouvellement protéique cellulaire en clivant l'extrémité N-terminale des peptides comprenant 4 à 8 acides aminés issus de l'activité catalytique de ces peptidases (206). La figure 13 schématise le rôle de la DPP3 dans le renouvellement protéique.

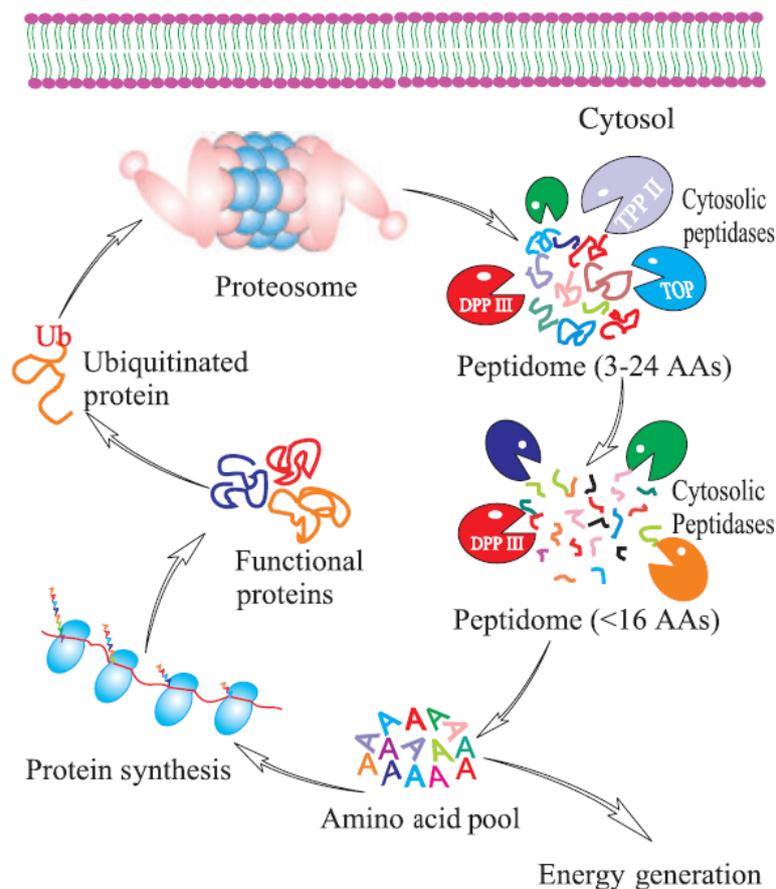


Figure 12: rôle de DPP3 dans le renouvellement protéique cellulaire

Une petite fraction du peptidome résiste à l'action des peptidases. Ces peptides résistants vont être présentés à la surface des cellules couplés au complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I) pour qu'ils soient détruits (206). Les aminopeptidases cytosoliques, incluant la DPP3, clivent l'extrémité N-terminale de ces précurseurs antigénique du CMH I et vont donc limiter leur présentation aux cellules effectrices. En cas de surexpression de ces aminopeptidases, la présentation des peptides antigéniques du CMH I aux cellules effectrices immunitaires peut alors être limitée et être responsable de nombreuses pathologies (néoplasie, etc) (206).

ii. Effets systémiques de la DPP3

Les petits peptides (<10 acides aminés, notamment les peptides opioïdes, les enképhalines, les endomorphines, les angiotensines et les hémopressines (262)) sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, comme la transduction des signaux cellulaires (263–265), la modulation de la

douleur (262, 266), la régulation de la pression artérielle (267, 268), et la reproduction (269, 270). Ils peuvent agir localement ou être relargués (sang, urines etc) pour agir à distance (206).

La DPP3 a une haute affinité pour les enképhalines, les endomorphines et les angiotensines (206). Comme vu plus haut, les enképhalines sont des substances semblables aux dérivés morphiniques (206), synthétisés par les cellules enképhalinerigiques du système neuro-endocrine (271), participant notamment à la réduction de la douleur en se fixant sur les récepteurs opioïdes de type δ (206). En 2010, Chadwick a démontré que la DPP3 était co-localisée au niveau de la membrane synaptique avec les enképhalines dans des cerveaux de souris (243). Il a été démontré, dans ce même travail, la capacité qu'avait la DPP3 à hydrolyser préférentiellement ce type de peptides à pH physiologique (243) démontrant ainsi que la DPP3 participait à la modulation de la douleur au niveau central (272, 273). De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de DPP3 corticale dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer démontrait le rôle de la peptidase dans la pathogénèse de la maladie (243).

De nombreux autres rôles de DPP3 ont été décrits (régulation endocrine (274–278), spermatogénèse (279), immunomodulation (267, 268) et prolifération cellulaire (280).

Les endomorphines (EM-1 et EM-2) appartiennent à la classe des peptides endogènes et se fixent spécifiquement sur les récepteurs couplés aux protéines G. Ils présentent une affinité importante pour les récepteurs impliqués dans la réduction de la perception de la douleur (206). Ces récepteurs sont largement distribués au niveau du système nerveux central des mammifères, notamment à l'étage cérébral, mais sont aussi localisés au niveau de la rate, du thymus, du plasma, des cellules immunitaires et de l'hypophyse (206). Ainsi, la modulation de l'activité de ces peptides par la DPP3 démontre l'implication de la peptidase dans la douleur, le stress et dans certaines fonctions complexes comme la vigilance et l'éveil (281). L'utilisation de la spinorphine, un inhibiteur de DPP3, atténuait la douleur des

rats induite par la bradykinine et inhibait l'activation des polynucléaires neutrophiles (220), démontrant au passage l'implication de la DPP3 dans la régulation des mécanismes inflammatoires (206).

L'angiotensine 2 est considérée comme la pierre angulaire du SRAA (282). Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques (211, 221). La DPP3 est impliquée dans le clivage des angiotensines 2 en angiotensine 4 et dans le clivage de l'angiotensine 4 en peptide non actif (219, 248, 254, 282). En 2016, Pang et al. ont démontré le rôle hypotenseur de DPP3 dans un modèle murin de d'hypertension artérielle induite par une infusion chronique d'angiotensine 2 (282). Dans ce travail, la réduction des chiffres tensionnels chez l'animal hypertendu suite à l'injection de DPP3 étaient accompagnés d'une baisse des taux circulants d'angiotensine 2 (282). Aucun effet n'était cependant observé lorsque l'hypertension artérielle était induite par une infusion chronique de noradrénaline, modèle qui ne s'accompagne pas d'une augmentation des taux circulants d'angiotensine (282). Le clivage de l'angiotensine 2 en angiotensine 4 par la DPP3 réduisait la pression artérielle systolique, diastolique et moyenne (282). Les effets du clivage de DPP3 sur les autres angiotensines (notamment la 4) ne sont pas connus à ce jour (206).

iii. La DPP3 prévient du stress oxydant

Le stress oxydant induit une translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 (nuclear related factor 2) (206). Une fois transloqué dans le noyau, Nrf2 va activer la transcription de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes (218, 283, 284). En 2007, Liu et al. ont démontré que la surexpression de la DPP3 dans des cellules de neuroblastome était impliquée dans la translocation nucléaire de Nrf2 (218) via la phosphatidyl inositol 3 kinase et la protéine kinase C (figure 14). Cependant le mécanisme exact par lequel la DPP3 induit la translocation nucléaire de Nrf2 reste inconnu à ce jour mais l'hypothèse d'une réduction du taux local d' H_2O_2 (facteur impliqué dans la transcription du gène codant pour la DPP3 en réponse à une augmentation du stress oxydant) par la peptidase est l'explication la plus probable (218, 285, 286). En favorisant la translocation nucléaire de Nrf2 en réponse à un stress oxydant, la DPP3

va favoriser l'activation de gène codant pour des protéines anti-oxydantes et notamment NAD(P)H :quinine oxidoreductase 1 (NQO1) (206). De plus, la DPP3 participe à l'élimination des protéines rendues non fonctionnelles suite à un dommage oxydatif en faisant partie intégrante du système ubiquitine protéasome (206) (figure 14).

La figure 15 résume l'ensemble des rôles connus à ce jour de la DPP3.

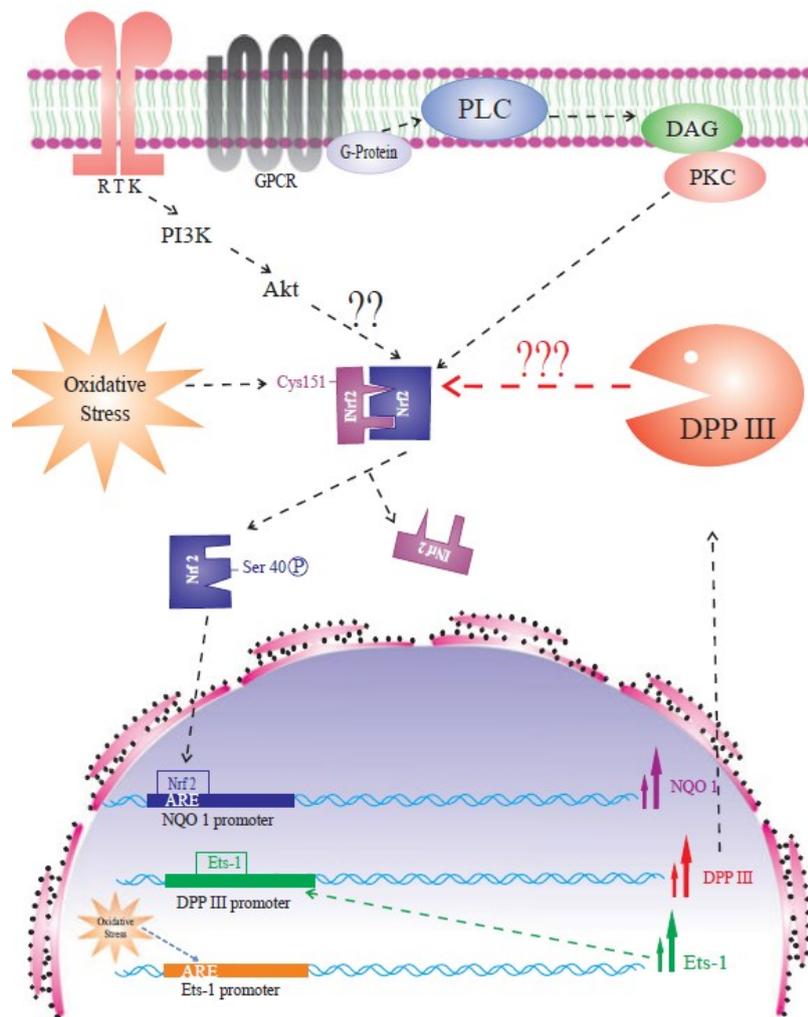


Figure 13 : rôles de la DPP3 au cours du stress oxydant cellulaire

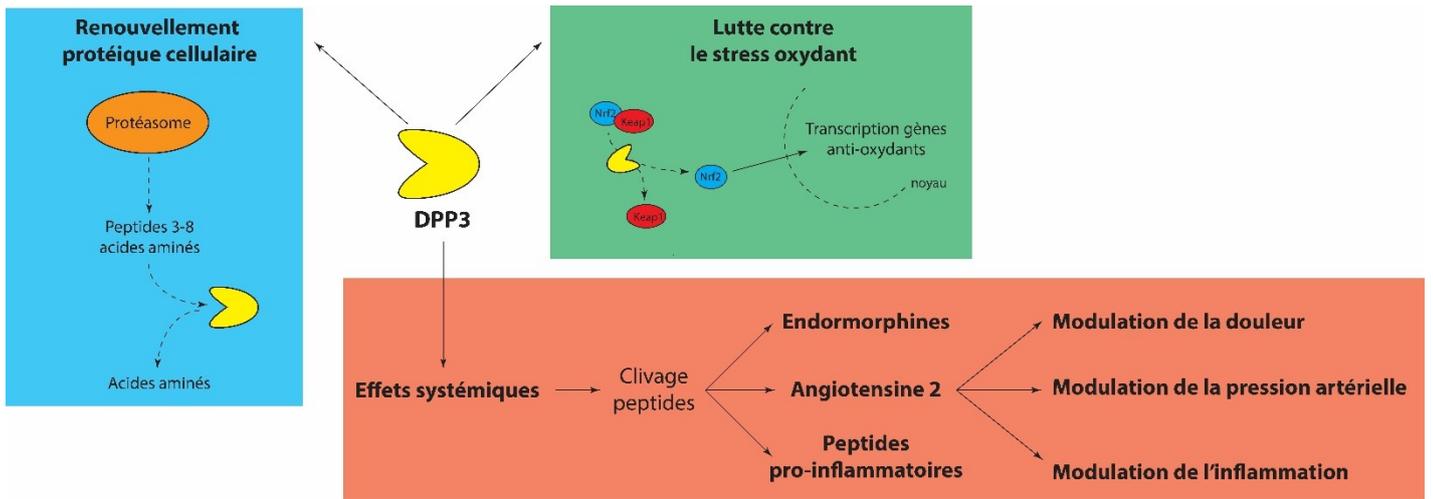


Figure 14 : schéma récapitulatif des principaux rôles de la DPP3

Objectifs généraux du travail

Objectifs généraux du travail

Les objectifs de ce travail étaient de déterminer :

- l'association entre le taux plasmatique de DPP3 dans le choc cardiogénique et l'évolution des patients
- les fonctions physiopathologiques de la DPP3 au cours de l'IC aiguë induite par :
 - un excès de catécholamines
 - le sepsis.

La stratégie utilisée pour pouvoir remplir cet objectif reposait sur :

- L'utilisation de DPP3 humaine (hDPP3) purifiée injectée chez l'animal sain.
- L'utilisation d'un anticorps bloquant spécifiquement la DPP3 (Procizumab).
- L'utilisation de deux modèles de défaillance cardiaque aiguë :
 - La défaillance cardiaque d'origine catécholaminergique (cardiomyopathie de stress) à l'isoproterenol chez la souris.
 - La défaillance cardiaque d'origine septique (cardiomyopathie septique) chez le rat par l'induction d'une péritonite stercorale par la technique de ligature et ponction caecale.
- En combinant des mesures physiologiques, biochimiques et biologiques.

Trois articles seront développés :

- **Article 1:** "Circulation dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial" publié dans *European Journal of Heart Failure*.
- **Article 2:** "Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics" publié dans *European Journal of Heart Failure*.

- **Article 3** : “Circulating dipeptidyl peptidase 3 inhibition restores cardiac function in a sepsis induced model in rats: a proof of concept study” en cours de soumission dans *Shock*.

Article 1

Rôle de DPP3 dans la défaillance hémodynamique du choc
cardiogénique : résultats de l'étude OptimaCC

Rôle de DPP3 dans la défaillance hémodynamique du choc cardiogénique : résultats de l'étude OptimaCC

1. Introduction

Le choc cardiogénique est défini comme une diminution persistante du débit cardiaque responsable d'une hypotension artérielle, d'une hypoperfusion d'organes et d'une hyperlactatémie (287–289). Les étiologies du choc cardiogénique sont nombreuses mais l'infarctus du myocarde d'origine ischémique est la principale étiologie (80%) (55, 287–289). Le choc cardiogénique réfractaire, qui est la forme la plus sévère du choc cardiogénique, apparaît dans les heures ou les jours suivants l'admission en réanimation et n'a pas de définition précise ni consensuelle (290). Cependant, il est couramment admis que le choc cardiogénique qui ne répond pas à des doses importantes d'inotropes ni de vasopresseurs malgré une volémie optimale peut être considéré comme réfractaire. La physiopathologie du choc cardiogénique réfractaire repose sur un débit cardiaque très abaissé et un état d'inflammation systémique majeur altérant le métabolisme des molécules vasoconstrictrices endogènes, principalement les catécholamines, la vasopressine et l'angiotensine 2 (291). Malgré une prise en charge optimale reposant notamment sur le traitement étiologique et la mise en place d'une assistance circulatoire, le taux de mortalité du choc cardiogénique reste très élevé (supérieure 50%) (292).

De nombreux scores clinico-biologiques (comme le score SAVE et le score ENCOURAGE) ont été développés pour tenter de prédire la mortalité des patients en état de choc réfractaire sous assistance circulatoire (292–294) mais aucun d'entre eux n'était assez spécifique ni efficace. Une prédiction précoce d'évolution vers un état de choc cardiogénique réfractaire des patients en état de choc cardiogénique est importante puisqu'elle permettrait d'orienter plus rapidement ces patients vers des centres adaptés, de limiter la survenue de défaillances d'organes et d'initier, si besoin, une assistance circulatoire (295, 296). Certains biomarqueurs ont montré un bénéfice dans la stratification du risque de passage vers un état de choc réfractaire (297). Actuellement, la lactatémie plasmatique, qui mesure le degré d'hypoxie tissulaire, est considérée comme le biomarqueur de la surveillance de survenue de

défaillances d'organes (297). Cependant, son augmentation est tardive par rapport à la survenue de la défaillance d'organes (298–300). La DPP3 est une protéase principalement impliquée dans le clivage de l'angiotensine 2 et la dégradation des enképhalines (298–300). De récents travaux ont démontré que les taux de DPP3 étaient augmentés chez les patients en choc septique (301) et cardiogénique (302). Nous avons émis l'hypothèse que les taux de DPP3 pouvaient être associés au risque de survenue de la défaillance hémodynamique et à la survie des patients en état de choc cardiogénique.

2. Publication dans *European Journal of Heart Failure* (2019)



Circulating dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial

Koji Takagi¹, Alice Blet^{1,2}, Bruno Levy³, Benjamin Deniau^{1,2}, Ferial Azibani¹, Elodie Feliot^{1,2}, Andreas Bergmann⁴, Karine Santos⁴, Oliver Hartmann⁴, Etienne Gayat^{1,2,5}, Alexandre Mebazaa^{1,2,5}*, and Antoine Kimmoun^{1,3}

¹Inserm UMR-S 942, Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT), University of Paris, Paris, France; ²Department of Anaesthesiology, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis–Lariboisière, AP-HP, Paris, France; ³Intensive Care Medicine Brabois, CHRU de Nancy, INSERM U 1116, 54511, Vandoeuvre-les-Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France; ⁴ATEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany; and ⁵Université de Paris, Paris, France

Received 2 July 2019; revised 3 July 2019; accepted 3 August 2019

Aims

Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a protease involved in the degradation of cardiovascular mediators. Its administration has been shown to be associated with impaired cardiac contraction and kidney haemodynamics while its inhibition restored cardiac contraction in a pre-clinical model of severe heart failure in mice. Circulating DPP3 (cDPP3) was found to be elevated in shock. The present study aims to assess the association between cDPP3 and worsening haemodynamics, namely refractory shock, in a cohort of cardiogenic shock (CS).

Methods and results

This is an ancillary study of OptimaCC, a prospective, double-blind, multicentre, randomized study assessing efficacy and safety of catecholamines in 57 patients with CS after acute myocardial infarction. cDPP3 was measured in plasma at inclusion, 24 h, 48 h, and 72 h, and haemodynamic and biological parameters were recorded at inclusion. cDPP3 values were higher in refractory CS than non-refractory CS at inclusion (median [interquartile range]; 76 [37.9–238.7] ng/mL vs. 32.8 [23.9–47.6] ng/mL $P=0.014$), at 24 h ($P < 0.001$) and up to 48 h ($P=0.027$). Furthermore, cDPP3 at inclusion discriminated CS patients who did develop refractory shock vs. non-refractory with an area under the curve of 0.73 (95% confidence interval [CI] 0.55–0.92). The high cDPP3 group (cDPP3 ≥ 59.1 ng/mL) at inclusion had a higher Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II), lower cardiac index and lower estimated glomerular filtration rate. More importantly, in CS patients with high cDPP3 at inclusion, those who rapidly decreased cDPP3 at 24 h exhibited a striking reduction in the occurrence of refractory shock and death.

Conclusion

In CS patients, cDPP3 gives an early prediction of outcome, including development of refractory status and/or survival. Clinical Trial Registration: [clinicaltrials.gov Identifier NCT01367743](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01367743)

Keywords

Biomarkers • Cardiogenic shock • Outcome

Introduction

Cardiogenic shock (CS) could be defined as a persistent low cardiac output state resulting in arterial hypotension, organ hypoperfusion, and hyperlactataemia^{1,2}. Though aetiologies of CS are numerous, acute myocardial infarction (AMI) is found in

80%.^{1,4} Refractory CS, the most severe form of CS, appears in the hours or days following intensive care unit (ICU) admission and has no consensual definition.⁵ However, it is recognized that CS not responding to increasing doses of inotrope and vasopressor despite optimal preload could be considered as refractory. Pathophysiology of refractory CS includes an extremely low cardiac output and

*Corresponding author. Department of Anaesthesiology, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis–Lariboisière, AP-HP, Paris, France. Tel: +33 1 49958071, Fax: +33 1 49958073, Email: alexandre.mebazaa@aphp.fr

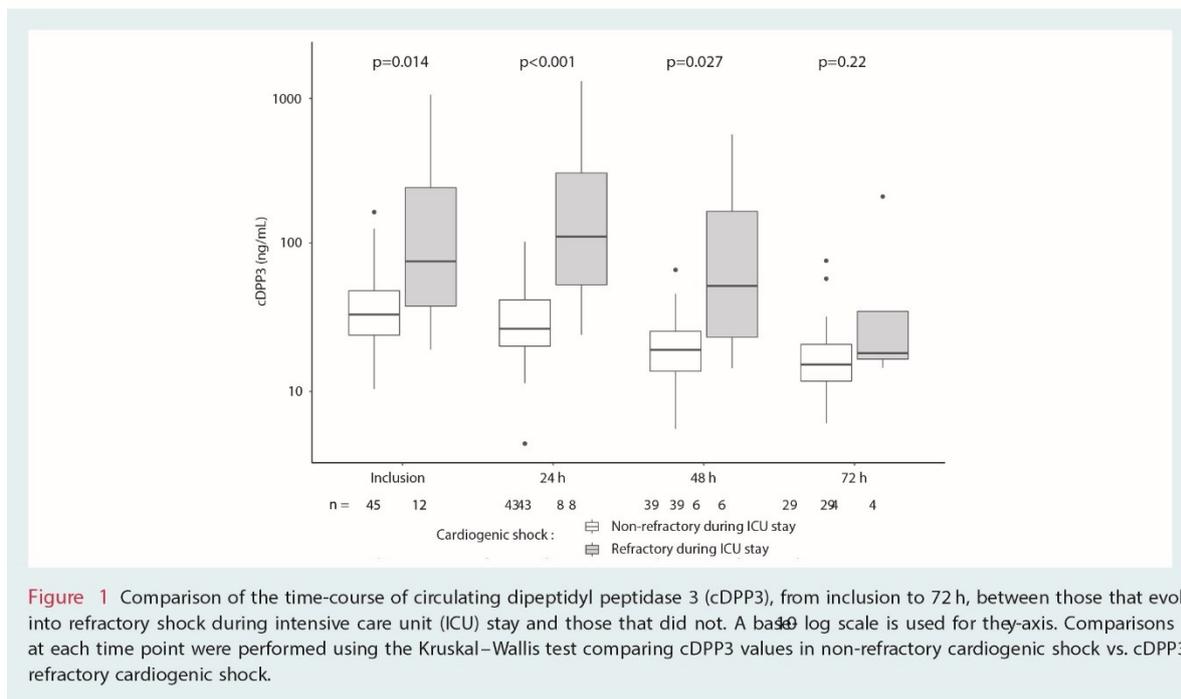


Figure 1 Comparison of the time-course of circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3), from inclusion to 72 h, between those that evolved into refractory shock during intensive care unit (ICU) stay and those that did not. A base 10 log scale is used for the y-axis. Comparisons at each time point were performed using the Kruskal–Wallis test comparing cDPP3 values in non-refractory cardiogenic shock vs. cDPP3 in refractory cardiogenic shock.

a high level of inflammation impairing the metabolism of endogenous vasoconstrictors, namely catecholamines, vasopressin and/or angiotensin II. Despite advanced management, including aetiological treatment and mechanical circulatory support (MCS), the mortality rate of refractory CS in ICU remains unacceptably high, higher than 50%.⁷

Several scores including the SAVE score, ENCOURAGE score, and modified SAVE score were developed to predict the mortality of refractory CS in patients already on MCS.^{8–10} In contrast, no tools have yet been developed to predict worsening from CS to refractory CS. An early risk stratification for patients with CS is crucial to refer patients to the right healthcare centre, to avoid the occurrence of organ dysfunction and initiate, if necessary, MCS.^{11,12} With this in mind, few biomarkers have been proved to be beneficial in risk stratification of patients with CS. For instance, lactate, the standard measure of tissue hypoxia, is a biomarker of organ failure that is too late.^{3–15} Circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) is a protease involved in the degradation of angiotensin II and enkephalins.^{6–18} Recently, it has been shown that high values of cDPP3 were found in critically ill patients suffering from septic shock¹⁹ and CS.²⁰ We hypothesize that cDPP3 might be associated with alterations in haemodynamics and survival in CS patients.

Methods

Study design

This study is an ancillary analysis from the OptimaCC trial. The study was approved by the Nancy hospital institutional review board and was registered on clinicaltrials.gov (NCT01367743). The princeps study was

a multicentre, double-blind, randomized trial of 57 patients conducted in France between September 2011 and August 2016 that compared the use of epinephrine vs. norepinephrine in patients with CS after AMI.

The primary outcome was the change in cardiac index and the secondary outcomes were changes in other haemodynamic variables, cardiac power index, lactate levels, lactate clearance, biomarker levels, and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score evolution. A detailed description of the study design and main results have been previously published.⁸ Of note, in 2015 the safety monitoring board reported a significant imbalance between the epinephrine and norepinephrine groups for the occurrence of refractory CS. This safety event led to the early termination of the study in 2016 with 57/80 patients included.

Participants and inclusion, non-inclusion criteria in the princeps study

Inclusion criteria were adult patients with a CS due to AMI treated by percutaneous coronary intervention. CS was defined by systolic arterial pressure <90 mmHg or mean arterial pressure <65 mmHg without vasopressor or need for vasopressors to correct hypotension, cardiac index <2.2 L/min/m² in the absence of vasopressor or inotrope therapy, and at least one evidence of tissue hypoperfusion. On pulmonary artery catheterization, pulmonary artery occlusion pressure had to be >15 mmHg or echocardiography had to evidence high filling pressure. Left ventricular ejection fraction had to be <40% on echocardiography without inotrope support. Non-inclusion criteria were mainly: shock of other origin; immediate indication for MCS; cardiac arrest with early signs of cerebral anoxia; and septic, toxic, and obstructive cardiomyopathy. Refractory CS was previously defined²¹

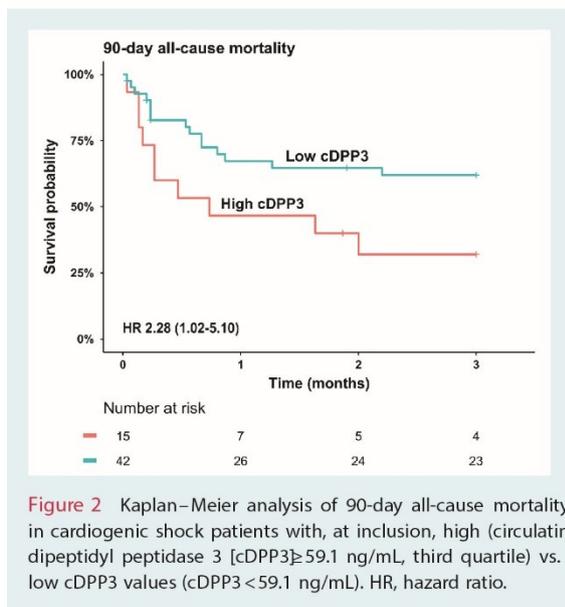


Figure 2 Kaplan–Meier analysis of 90-day all-cause mortality in cardiogenic shock patients with, at inclusion, high (circulating dipeptidyl peptidase 3 [cDPP3] ≥ 59.1 ng/mL, third quartile) vs. low cDPP3 values (cDPP3 < 59.1 ng/mL). HR, hazard ratio.

as a CS with major cardiac dysfunction assessed according to echocardiography, elevated lactate level, acute deterioration of organ function despite the use of > 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ of epinephrine/norepinephrine or dobutamine > 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ and/or intra-aortic balloon support and sustained hypotension (systolic arterial pressure < 90 mmHg or mean arterial pressure < 65 mmHg) despite adequate intravascular volume.

Study endpoints

For this ancillary study, the primary endpoint was to assess the association between cDPP3 and the occurrence of refractory CS. Secondary endpoints included 90-day all-cause mortality and relationships between cDPP3, and haemodynamic and biological parameters.

Study treatment and protocol

The initial protocol was detailed in the principles paper. In summary, patients with CS already treated by a vasopressor had to be randomized in the 6 h following the initiation of this vasopressor. After initiation of the study drug, the initial open-label vasopressor was discontinued. The study drug could be switched to an open-label vasopressor in the case of refractory CS as defined above or refractory arrhythmias. The patient was considered to be weaned from the study drug after 24 h without any vasopressor support. Haemodynamic variables were collected closely during the first 72 h. Biological variables were collected daily during the first 7 days and thereafter on days 14, 21, and 28. All-cause mortality was recorded until 90 days. cDPP3 measurements were achieved, blinded from clinical data, in the laboratories of 4TEEN4 Therapeutics GmbH (Hennigsdorf, Germany) in samples collected at inclusion, 24 h, 48 h, and 72 h.

Statistical analyses

Analytical data are the median with 25th and 75th percentiles (median [interquartile range]) for continuous variables, whereas categorical variables are presented as numbers and percentages. Comparisons of inclusion characteristics according to groups were conducted by using Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests for continuous variables and the Fisher exact test or χ^2 test for categorical variables. Cox proportional-hazards regression was used to analyse the effect of cDPP3 and other variables on survival in univariable analyses. Serial biomarker data were analysed by time-dependent Cox regression analysis, and the added value was determined via nested models. Biomarker data was log-transformed. The concordance index (C index) is given as an effect measure. It is equivalent to the concept of area under the curve (AUC) adopted for binary outcome. For illustration, survival curves were drawn according to the third quartile values by using the Kaplan–Meier method. The predictive value of cDPP3, lactate, and SOFA score for the occurrence of refractory CS was estimated by a receiver-operating characteristic curve analysis. A two-sided P -value < 0.05 was regarded as statistically significant. Statistical analyses were performed using R, version 3.51 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Population characteristics

A total of 57 patients with CS were studied, including 2 patients that developed refractory CS during ICU stay. The characteristics of the population at inclusion according to the occurrence of refractory CS during ICU stay are presented in Table S1 in the Supplementary material online. Briefly, refractory CS patients compared with non-refractory CS patients had higher age (78 [70–83] years vs. 66 [54–74] years, $P = 0.016$), were mainly female (75% vs. 22%, $P = 0.002$), had higher Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) (74 [57–78] vs. 52 [43–65], $P = 0.016$), higher aspartate transaminase (AST) (1209 [558–1660] IU/L vs. 428 [189–696] IU/L, $P = 0.011$) and higher lactataemia (5.4 [3–5.9] mmol/L vs. 3.0 [2.2–5.2] mmol/L, $P = 0.038$). Ninety-day all-cause mortality rate was higher in refractory CS patients compared with non-refractory CS patients (100% vs. 29%, $P < 0.001$).

Circulating dipeptidyl peptidase 3 time-course in refractory and non-refractory shock

Figure 1 shows that cDPP3 values (global coefficient of variation: 193.4%) were higher in refractory CS than non-refractory CS at inclusion (76.1 [37.9–238.7] ng/mL vs. 32.8 [23.9–47.6] ng/mL, $P = 0.014$), at 24 h ($P < 0.001$) and up to 48 h ($P = 0.027$). To discriminate patients who did develop refractory CS from those who did not, cDPP3 at inclusion had an AUC of 0.73 (95% confidence interval [CI] 0.55–0.92). For comparison, lactate at inclusion had an AUC of 0.71 (95% CI 0.57–0.85) and the SOFA score an AUC of 0.61 (95% CI 0.42–0.81). Of note, there was no influence of the vasopressor infused, epinephrine or norepinephrine, on cDPP3 values at any time point (online supplemental Figure S1).

Table 1 Comparison of characteristics of cardiogenic shock patients between high circulating dipeptidyl peptidase 3 and low circulating dipeptidyl peptidase 3 groups at inclusion

| Variables | Missing values | High cDPP3 at inclusion (n = 15) | Low cDPP3 at inclusion (n = 42) | P-value |
|---|----------------|----------------------------------|---------------------------------|---------|
| Randomization arm | | | | 0.72 |
| Epinephrine | 0 (0%) | 6 (40%) | 21 (50%) | |
| Norepinephrine | 0 (0%) | 9 (60%) | 21 (50%) | |
| Demographics | | | | |
| Age (years) | 0 (0%) | 75 [63–80] | 66 [54–76] | 0.18 |
| Female sex | 0 (0%) | 7 (47%) | 12 (29%) | 0.34 |
| Cardiovascular history | | | | |
| Hypertension | 0 (0%) | 6 (40%) | 8 (19%) | 0.20 |
| Diabetes | 0 (0%) | 2 (13%) | 4 (10%) | 0.65 |
| Stroke | 0 (0%) | 2 (13%) | 2 (5%) | 0.28 |
| Myocardial infarction | 0 (0%) | 2 (13%) | 2 (5%) | 0.28 |
| Severity scores | | | | |
| SAPS II | 1 (2%) | 74 [57–80] | 48 [43–61] | 0.001 |
| SOFA score | 0 (0%) | 11 [9–12] | 9 [8–12] | 0.19 |
| Clinical presentation at inclusion | | | | |
| Body mass index (kg/m ²) | 3 (5%) | 26.6 [22.6–27.6] | 24.7 [22.1–27.4] | 0.58 |
| Heart rate (bpm) | 0 (0%) | 91 [74–102] | 100 [84–112] | 0.14 |
| SVRI (dyne*s*cm ⁻⁵ *m ²) | 18 (32%) | 3001 [2077–3518] | 2333 [1871–2633] | 0.20 |
| SvO ₂ (%) | 6 (11%) | 69 [51–74] | 72 [65–79] | 0.32 |
| Mechanical ventilation | 6 (11%) | 11 (100%) | 35 (88%) | 0.57 |
| LVEF (%) | 5 (9%) | 34 [30–38] | 35 [25–40] | 0.89 |
| ST-segment elevation | 0 (0%) | 15 (100%) | 40 (95%) | 1.00 |
| Laboratory findings at inclusion | | | | |
| NT-proBNP (pg/mL) | 1 (2%) | 5275 [1585–15834] | 1846 [562–5972] | 0.23 |
| Outcome | | | | |
| Refractory cardiogenic shock | 0 (0%) | 7 (47%) | 5 (12%) | 0.014 |
| MCS implantation | 0 (0%) | 2 (13%) | 2 (5%) | 0.28 |
| Death within 28 days | 3 (5%) | 8 (53%) | 13 (31%) | 0.22 |
| Death within 90 days | 5 (9%) | 10 (67%) | 15 (36%) | 0.077 |

Data are presented as median [IQR] or n (%).

High cDPP3 corresponds to cDPP3 ≥ 59.1 ng/mL (third quartile) and low cDPP3 corresponds to < 59.1 ng/mL.

cDPP3, circulating dipeptidyl peptidase 3; IQR, interquartile range; LVEF, left ventricular ejection fraction; MCS, mechanical circulatory support; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SvO₂, mixed venous oxygen saturation; SVRI, systemic vascular resistance index.

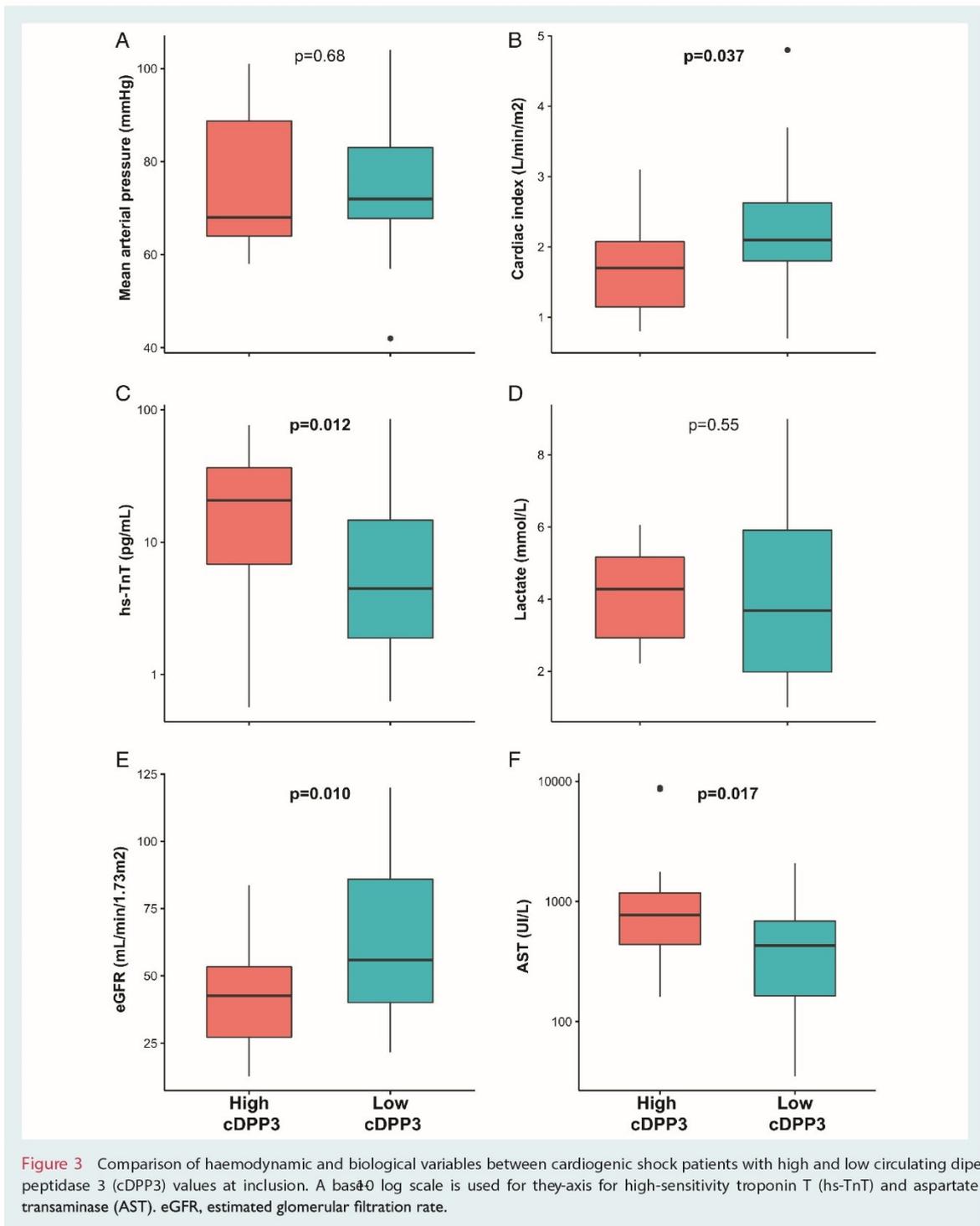
Association of early circulating dipeptidyl peptidase 3 values and outcome

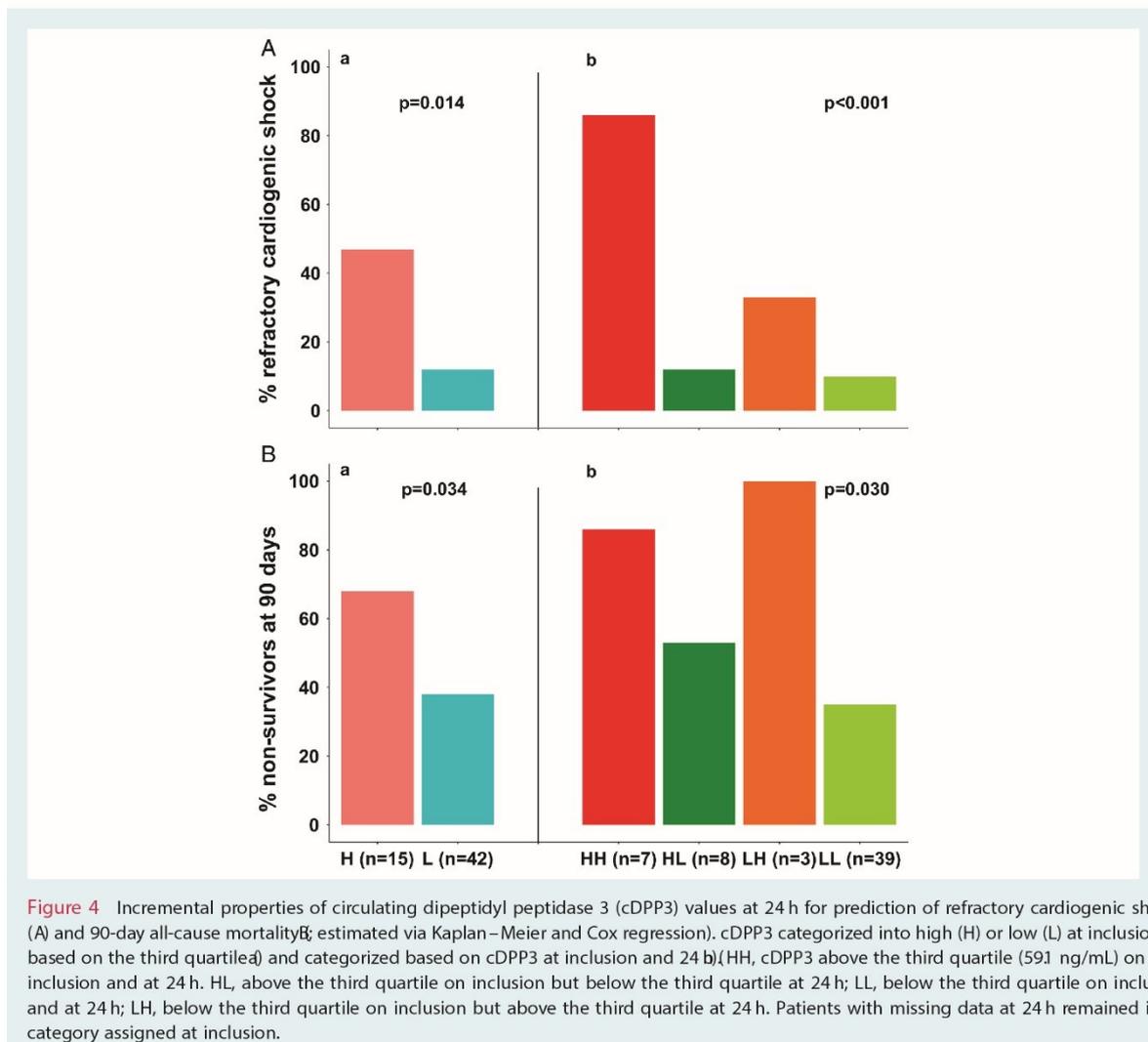
Among the 57 patients included, 25 (44%) died within 90 days (online supplementary Table S2). cDPP3 values were greater in the first 48 h in 90-day non-survivors than survivors (online supplementary Figure S2). Cox regression analysis found an association between the values of cDPP3 at inclusion and 90-day mortality (C index: 0.603, $P = 0.034$) but no association with the SOFA score, lactate, or high-sensitivity troponin T (hs-TnT) ($P > 0.05$). When analysing 90-day risk of death by quartile of cDPP3 (Figure S3) in the supplementary material online shows similar risk of death for the first three quartiles of cDPP3, combined under the name 'low cDPP3' (cDPP3 < 59.1 ng/mL) and a greater risk of death for the fourth quartile of cDPP3 (high cDPP3 group, cDPP3 ≥ 59.1 ng/mL): unadjusted hazard ratio (HR) 2.28 (1.02–5.10) (Figure 2).

The characteristics of the population at inclusion according to the third quartile of cDPP3 are presented in Table 1 and Figure 3.

Briefly, patients in the high cDPP3 group had higher SAPS II (74 [57–80] vs. 48 [43–61], $P = 0.001$), similar mean arterial pressure (68 [64–89] mmHg vs. 72 [68–83] mmHg, $P = 0.68$), lower cardiac index (1.7 [1.2–2.1] L/min/m² vs. 2.1 [1.8–2.6] L/min/m², $P = 0.037$), higher hs-TnT (20.7 [6.9–36.6] pg/mL vs. 4.5 [1.9–14.7] pg/mL, $P = 0.012$), similar lactate (4.3 [2.9–5.2] mmol/L vs. 3.7 [2.0–5.9] mmol/L, $P = 0.55$), lower estimated glomerular filtration rate (42.6 [27.2–53.3] mL/min vs. 55.9 [40.1–85.9] mL/min, $P = 0.010$), and higher AST (772 [438–1178] IU/L vs. 428 [164–668] IU/L, $P = 0.017$) compared with the low cDPP3 group (Table 1 and Figure 3).

Some patients exhibited marked variations in cDPP3 values during the first 24 h after inclusion that led to a change in outcome. Indeed, patients with a high concentration of cDPP3 at inclusion but a low concentration at 24 h (high to low group, HL) had a striking reduction in refractory CS occurrence and reduced 90-day mortality compared with patients with high and sustained cDPP3 values (high to high group, HH) (Figure 4). In contrast, patients with





low cDPP3 at inclusion and increased values at 24 h (low to high group, LH) had a marked increase in mortality when compared with patients with low and sustained cDPP3 values (low to low group, LL) (HR 6.33 [1.28–31.30]) (Figure 4).

Discussion

The present study showed that high cDPP3 measured in CS patients at ICU admission was associated with high rate of worsening haemodynamics, namely refractory shock, especially for those who had a persistent elevation of cDPP3 in the day following admission, while those for whom cDPP3 levels rapidly dropped exhibited a striking improvement in outcome.

OptimaCC is a homogeneous and severe population of CS with low cardiac index despite high doses of catecholamines at ICU admission.²¹ This presentation reflected the current definition of

CS, which was associated with a high degree of inflammation and vasoplegia.^{26,22} In line with this clinical presentation, mortality rate was also similar to previously published studies.^{23–25} Some of those patients present a worsened clinical condition during the initial days and develop refractory CS. The latter is defined as CS with persistent high dose of vasopressor(s)^{26–28} Recently, worsening CS was also classified as category D (deteriorating/doom) with the need of an escalating number or intensity of intravenous therapies to address hypoperfusion or addition of MCS.⁹ Our study shows that two early measures of cDPP3 at inclusion and a day later may indicate either a potential need for escalating therapies if cDPP3 is continuously high or de-escalating therapies if high cDPP3 at ICU admission rapidly returns toward normal values. Accordingly, cDPP3 might add to clinical and haemodynamic parameters and lactate to decide on the escalation or de-escalation of aggressive therapies in CS patients.

DPP3 is a cytosolic enzyme involved in the cleavage of cardiovascular mediators. The present study confirms the previous observation that CS patients with high cDPP3 have worse haemodynamics, renal function, and mortality rate.²⁰ Though association between high cDPP3 and occurrence of refractory shock remains unknown, a recent publication from our group showed that intravenous administration of DPP3 immediately depressed cardiac contraction while DPP3 inhibition restored cardiac contraction in a heart failure mouse model.²⁰ Our present study suggests that, in patients with CS, high values of cDPP3 may induce striking negative inotropic action that worsen the already impaired cardiac contraction and lead to refractory shock.

We found that high cDPP3 in the two consecutive days following admission was associated with bad outcomes while a drop in cDPP3 from high to low values was associated with a more favourable outcome. DPP3 is mainly an intracellular protein with a short half-life.²⁰ Accordingly, it could be suggested that persistent elevation of cDPP3 in some CS patients may be related to high cell death (necrosis) compared with CS patients who normalized cDPP3 values. Finally, inhibition of cDPP3 that may rapidly reduce cDPP3 activity might be beneficial by improving haemodynamic parameters in CS patients, as recently shown in an animal model.²¹

Limitations

We acknowledge several limitations in this study. Firstly, our results must be viewed as a post hoc analysis of a previously published study performed in nine centres, only in France, with other primary endpoints. Accordingly, the results found will need to be confirmed in further multi-national studies with pre-specified endpoints. Secondly, there were major differences in management between patients who went on to develop refractory shock and those who recovered. Thirdly, physiological functions and metabolism of cDPP3 are still poorly understood. For instance, the impact of acute kidney injury on cDPP3 metabolism is unknown. Likewise, previous medications by angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker before the occurrence of CS were not recorded. The impact of these medications on cDPP3 metabolism are unknown and will need further studies. Fourthly, due to the small sample size, we were unable to perform adjusted survival analysis. Finally, future studies should confirm the value of repeated cDPP3 measurements.

Conclusions

The present study demonstrates that cDPP3 may predict early alteration in haemodynamics in CS patients. Though very early high cDPP3 has a bad prognostic value, a rapid normalization of cDPP3 values in the first day indicates a low rate of refractory shock and high survival.

Supplementary Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S 1. Comparison of characteristics of CS patients, at inclusion, between those that evolved into refractory shock during ICU stay or those that did not.

Table S2. Comparison of characteristics of CS patients between 90-day survivors and non-survivors.

Figure S 1. Comparison of time-course of cDPP3, from inclusion to 72 h, between epinephrine group and norepinephrine group.

Figure S2. Comparison of time-course of cDPP3, from inclusion to 72 h, between 90-day survivors and non-survivors.

Figure S3. Kaplan–Meier analysis of 90-day all-cause mortality by quartile for cDPP3 at inclusion.

Acknowledgements

We thank Dr Kevin Duarte, statistician in Nancy University Hospital, for his assistance with the data management.

Funding

This work was supported by a grant from the Institut national de la santé et de la recherche médicale–Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (200). DPP3 measurements were performed by 4TEEN4 Pharmaceuticals.

Conflict of interest: K.T. received speaker's honoraria from Otsuka, Sumitomo Dainippon, AstraZeneca, and Bayer and consultancy fees from Terumo. B.L. received lecture fees from Pulsion, Baxter, Orion, and Lilly; and has received consultant fees from Novartis, Orion, and Baxter. E.G. received a research grant from Spingotec and consultancy fees from Magnisense and Roche Diagnostics. A.M. reports personal fees from Novartis, Orion, Roche, Servier, Sanofi, Otsuka, Philips, grants and personal fees from Adrenomed, Abbott, grants from 4TEEN4 and A.M. owns fewer than 3000 euros shares of S-Form Pharma company. A.K. received speaker's honoraria from Baxter, MSD, and Gilead. B.D. and A.BI. were invited to a meeting in Henningsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. K.S. is employed at 4TEEN4 Pharmaceuticals. A.B. is CEO and shareholder at 4TEEN4 Pharmaceuticals. 4TEEN4 owns intellectual properties related to diagnostic use of DPP3. The other authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research authorship and/or publication of this article.

References

- Hollenberg SM, Kavinsky CJ, Parrillo JE. Cardiogenic shock. *Ann Intern Med* 1999;131:47–59.
- Reynolds HR, Hochman JS. Cardiogenic shock: current concepts and improving outcomes. *Circulation* 2008;117:686–697.
- Tarvasmäki T, Haapio M, Mebazaa A, Sionis A, Silva-Cardoso J, Tolppanen H, Lindholm MG, Pulkki K, Parisi J, Harjola VP, Lassus J. Acute kidney injury in cardiogenic shock: definitions, incidence, haemodynamic alterations, and mortality. *Eur J Heart Fail* 2018;20:572–581.
- Thiele H, Zeymer U, Neumann FJ, Ferenc M, Olbrich HG, Hausleiter J, Richardt G, Hennesdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Fuhrmann J, Böhm M, Ebel H, Schneider S, Schuler G, Werdan K; IABP-SHOCK II Trial Investigators. Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N Engl J Med* 2012;367:1287–1296.
- Champion S. Extracorporeal membrane oxygenation in the therapy of cardiogenic shock (ECMO-CS): the need for a better definition of refractory cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2018;20:197–198.

6. Hochman JS. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm. *Circulation* 2003;107:2998–3002.
7. Shah M, Patnaik S, Patel B, Ram P, Garg L, Agarwal M, Agrawal S, Arora S, Patel N, Wald J, Jorde UP. Trends in mechanical circulatory support use and hospital mortality among patients with acute myocardial infarction and non-infarction related cardiogenic shock in the United States. *Clin Res Cardiol* 2018;107:287–303.
8. Schmidt M, Burrell A, Roberts L, Bailey M, Sheldrake J, Rycus PT, Hodgson C, Scheinkestel C, Cooper DJ, Thiagarajan RR, Brodie D, Pellegrino V, Pilcher D. Predicting survival after ECMO for refractory cardiogenic shock: the survival after veno-arterial-ECMO (SAVE)-score. *Eur Heart J* 2015;36:2246–2256.
9. Muller G, Flecher E, Lebreton G, Luyt CE, Trouillet JL, Bréchet N, Schmidt M, Mastroianni C, Chastre J, Leprince P, Anselmi A, Combes A. The ENCOUR-AGE mortality risk score and analysis of long-term outcomes after VA-ECMO for acute myocardial infarction with cardiogenic shock. *Intensive Care Med* 2016;42:370–378.
10. Chen WC, Huang KY, Yao CW, Wu CF, Liang SJ, Li CH, Tu CY, Chen HJ. The modified SAVE score: predicting survival using urgent veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation within 24 hours of arrival at the emergency department. *Crit Care* 2016;20:336.
11. Harjola VP, Lassus J, Sionis A, Køber L, Tarvasmäki T, Spinar J, Parissis J, Banaszewski M, Silva-Cardoso J, Carubelli V, Di Somma S, Tolppanen H, Zeymer U, Thiele H, Nieminen MS, Mebazaa A; CardShock Study Investigators; GREAT network. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2015;17:501–509.
12. Harjola VP, Parissis J, Brunner-La Rocca HP, Čelutkienė J, Chioncel O, Collins SP, De Backer D, Filippatos GS, Gayat E, Hill L, Lainscak M, Lassus J, Masip J, Mebazaa A, Miró Ò, Mortara A, Mueller C, Mullens W, Nieminen MS, Rudiger A, Ruschitzka F, Seferovic PM, Sionis A, Vieillard-Baron A, Weinstein JM, de Boer RA, Crespo-Leiro MG, Piepoli M, Riley JP. Comprehensive in-hospital monitoring in acute heart failure: applications for clinical practice and future directions for research. A statement from the Acute Heart Failure Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 2018;20:1081–1099.
13. Bakker J, Gris P, Coffernils M, Kahn RJ, Vincent JL. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *J Surg* 1996;171:221–226.
14. Attaná P, Lazzeri C, Chiostrì M, Picariello C, Gensini GF, Valente S. Lactate clearance in cardiogenic shock following ST elevation myocardial infarction: a pilot study. *Acute Card Car* 2012;14:20–26.
15. Zhang Z, Xu X. Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis*. *Crit Care Med* 2014;42:2118–2125.
16. Allard M, Simonnet G, Dupouy B, Vincent JD. Angiotensin II inactivation process in cultured mouse spinal cord cells. *J Neurochem* 1987;48:1553–1559.
17. Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* 2011;278:3256–3276.
18. Ocaranza MP, Jalil JE. On endogenous angiotensin II antagonism in hypertension: The role of dipeptidyl peptidase III. *Hypertensio* 2016;68:552–554.
19. Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergmann A. Novel methods for the quantification of dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) concentration and activity in human blood samples. *Appl Lab Med* 2018. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027995>.
20. Deniau B, Rehfeld L, Santos K, Dienelt A, Azibani F, Sadoune M, Kounde PR, Samuel JL, Tolppanen H, Lassus J, Harjola VP, Vodovar N, Bergmann A, Hartmann O, Mebazaa A, Blet A. Circulating dipeptidyl peptidase-3 is a myocardial depressant factor: DPP3 inhibition rapidly and sustainably improves hemodynamics. *Eur J Heart Fail* 2019, in press.
21. Levy B, Clere-Jehl R, Legras A, Morichau-Beauchant T, Leone M, Frederique G, Quenot JP, Kimmoun A, Cariou A, Lassus J, Harjola VP, Meziani F, Louis G, Rossignol P, Duarte K, Girerd N, Mebazaa A, Vignon P. Epinephrine versus norepinephrine for cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Am Coll Cardiol* 2018;72:173–182.
22. Kohsaka S, Menon V, Lowe AM, Lange M, Dzavik V, Sleeper LA, Hochman JS; SHOCK Investigators. Systemic inflammatory response syndrome after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Crit Care Intern Med* 2005;165:1643–1650.
23. Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, Sanborn TA, White HD, Talley JD, Buller CE, Jacobs AK, Slater JN, Col J, McKinlay SM, Picard MH, Menegus MA, Boland J, Dzavik V, Thompson CR, Wong SC, Steingart R, Forman R, Aylward PE, Godfrey E, Desvigne-Nickens P, LeJemtel TH. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock? *N Engl J Med* 1999;341:625–634.
24. Thiele H, Akin I, Sandri M, Fuernau G, de Waha S, Meyer-Saraei R, Nordbeck P, Geisler T, Landmesser U, Skurk C, Fach A, Lapp H, Piek JJ, Noc M, Goslar T, Felix SB, Maier LS, Stepinska J, Oldroyd K, Serpytis P, Montalescot G, Barthelemy O, Huber K, Windecker S, Savonitto S, Torremante P, Vrints C, Schneider S, Desch S, Zeymer U; CULPRIT-SHOCK Investigators. PCI strategies in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock. *N Engl J Med* 2017;377:2419–2432.
25. The TRIUMPH Investigators*, Alexander JH, Reynolds HR, Stebbins AL, Dzavik V, Harrington RA, Van de Werf F, Hochman JS. Effect of tilarginine acetate in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock. *JAMA* 2007;297:1657.
26. Reventovich A, Barghash MH, Hochman JS. Management of refractory cardiogenic shock. *Nat Rev Cardio* 2016;13:481–492.
27. Mebazaa A, Combes A, van Diepen S, Hollinger A, Katz JN, Landoni G, Hajjar LA, Lassus J, Lebreton G, Montalescot G, Park JJ, Price S, Sionis A, Yannopoulos D, Harjola VP, Levy B, Thiele H. Management of cardiogenic shock complicating myocardial infarction. *Intensive Care Med* 2018;44:760–773.
28. Bassi E, Park M, Azevedo LCP. Therapeutic strategies for high-dose vasopressor-dependent shock. *Crit Care Res Pract* 2013;2013:654708.
29. Baran DA, Grines CL, Bailey S, Burkhoff D, Hall SA, Henry TD, Hollenberg SM, Kapur NK, O'Neill W, Ornato JP, Stelling K, Thiele H, van Diepen S, Naidu SS. SCAI clinical expert consensus statement on the classification of cardiogenic shock: this document was endorsed by the American College of Cardiology (ACC), the American Heart Association (AHA), the Society of Critical Care Medicine (SCCM), and the Society of Thoracic Surgeons (STS) in April 2019. *Catheter Cardiovasc Interv* 2019;94:29–37.

3. Discussion

Cette étude ancillaire de l'étude OptimaCC a démontré que des taux élevés de DPP3 mesurés chez des patients en choc cardiogénique d'origine ischémique à l'admission en réanimation étaient associés à un risque plus élevé de développer un choc cardiogénique réfractaire, particulièrement chez ceux dont les taux de DPP3 circulante restaient élevés dans les jours suivants l'admission. Ceux dont les taux diminuaient rapidement au cours de l'hospitalisation présentaient un meilleur pronostic.

La cohorte de l'étude OptimaCC était homogène et composée de patients présentant un état de choc cardiogénique sévère, avec notamment un index cardiaque bas malgré des doses importantes de catécholamines à l'admission en réanimation (31). Cet état de choc est caractérisé par un degré d'inflammation et de vasoplégie élevé (288, 291, 303). La mortalité des patients de l'étude OptimaCC était identique à celle des autres études sur le choc cardiogénique (44, 48, 55, 58). Certains patients ont développé par la suite un état de choc cardiogénique réfractaire, défini comme un état de choc cardiogénique nécessitant des doses très élevées de catécholamines et de vasopresseurs (18, 304, 305). Notre étude a pu démontrer que deux mesures précoces du taux de DPP3 circulant chez les patients atteints de choc cardiogénique (à l'admission en réanimation et dans les jours suivants), étaient associées à une éventuelle escalade thérapeutique (en termes de vasopresseurs et/ou d'assistance circulatoire) quand la concentration de DPP3 s'élève ou à une moindre nécessité de vasopresseurs et/ou d'assistance circulatoire lorsqu'elle diminue. Ainsi, la DPP3 pourrait être considéré comme un biomarqueur qui, associée au dosage du lactate, pourrait aider à la décision d'escalade ou de désescalade thérapeutique chez les patients en état de choc cardiogénique et ainsi prévenir les défaillances d'organes.

La DPP3 est une enzyme cytosolique principalement impliquée dans le clivage de médiateurs cardiovasculaires. Cette étude confirme les résultats d'études précédentes dans lesquelles des taux élevés de DPP3 étaient associés à un mauvais pronostic hémodynamique et rénal ainsi qu'à une mortalité plus élevée (301, 302). Le lien exact entre un taux élevé de DPP3 et la survenue d'un état de choc

cardiogénique réfractaire reste inconnu pour le moment, mais un récent travail réalisé par notre équipe a pu démontrer que l'injection de la DPP3 chez l'animal sain était responsable d'une dépression myocardique (302), alors que son inhibition par un anticorps spécifique dans un modèle de choc cardiogénique chez la souris normalisait la fraction de raccourcissement altérée suite aux injections d'isoprotérénol (302). D'après les résultats de nos travaux, des valeurs élevées de DPP3 circulant, en lien avec une nécrose cellulaire importante, pourraient avoir une action inotrope négative impactant encore plus la fonction cardiaque déjà altérée au cours du choc cardiogénique, menant alors au choc cardiogénique réfractaire.

Notre travail présentait plusieurs limites. Premièrement, il s'agissait d'une analyse post-hoc d'une étude française multicentrique. Les résultats nécessitent d'être confirmés par des études multicentriques internationales. Deuxièmement, des différences de prise en charge existaient entre les patients présentant un état de choc cardiogénique réfractaire et non réfractaire. Troisièmement, les mécanismes d'action de la DPP3 sont insuffisamment compris actuellement. Un traitement antérieur par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou des antagonistes de récepteurs à l'angiotensine 2, médicaments qui ont un retentissement sur les taux circulants d'angiotensines (et donc les substrats de la DPP3) n'ont pas été relevés chez ces patients. L'impact de ces thérapeutiques sur le métabolisme et les mécanismes d'action de la DPP3 sont inconnues et doivent être évalués dans les études futures. Quatrièmement, étant donné le faible nombre de patients inclus dans l'étude, une analyse de survie ajustée n'a pas pu être réalisée. De ce fait, les études futures devront confirmer l'intérêt des mesures répétées de la DPP3 circulante.

En conclusion, nous avons montré que des taux élevés de DPP3 circulante dans les jours suivants l'admission en réanimation de patients atteints de choc cardiogénique étaient associés à un plus mauvais pronostic que ceux dont les taux diminuaient au cours des premiers jours d'hospitalisation. La DPP3 est une enzyme intracellulaire dont la demi-vie est extrêmement courte. Des taux élevés persistants de DPP3 pourraient être secondaire à une nécrose cellulaire importante. Enfin, l'inhibition des taux élevés de

DPP3 circulante par un anticorps pourrait être bénéfique lorsque les taux sont anormalement élevés, comme cela vient d'être démontré dans un modèle animal de choc cardiogénique (302)

Article 2

Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor :
dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves
haemodynamics

Rôle de DPP3 dans la défaillance cardiaque aiguë dans un modèle de choc cardiogénique chez la souris

1. Introduction

L'IC aiguë est un syndrome multifactoriel secondaire à une atteinte cardiaque. Véritable problème de Santé Publique, elle s'accompagne d'une mortalité intra-hospitalière élevée (4 à 30% selon les études) (306–308). Malheureusement, sa physiopathologie n'est pas complètement élucidée, notamment d'un point de vue moléculaire, et les traitements disponibles sont insuffisants. La DPP3 est une métalloprotéinase ubiquitaire cytosolique impliquée dans le métabolisme des peptides comprenant 8 à 10 acides aminés (309). La DPP3 est impliquée dans la régulation de la pression artérielle (206, 282), de l'inflammation (206), et dans la modulation de la douleur (262). Les fonctions biologiques exactes de la DPP3 sont inconnues à ce jour et seules quelques études se sont intéressées à cette enzyme. Dans un modèle d'hypertension artérielle à l'angiotensine 2, Pang et al. avaient démontré le rôle hypotenseur de la DPP3 (282). La diminution des chiffres tensionnels était accompagnée d'une diminution de la concentration des taux circulants d'angiotensine 2 liée au clivage de l'hormone par DPP3 en angiotensine 4 (282). En 2018, une technique de mesure plasmatique de la DPP3 a été développée et une association positive entre les taux circulants de DPP3 et la mortalité de patients septiques avait été démontrée (301).

Ce travail visait à clarifier l'association entre les taux de DPP3 circulants et la mortalité chez les patients atteints de choc cardiogénique, et à déterminer le rôle de la DPP3 dans la défaillance cardiaque et rénale dans un modèle de choc cardiogénique chez la souris.

2. Publication dans *European Journal of Heart Failure* (2019)

Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics

Benjamin Deniau^{1†}, Linda Rehfeld^{2†}, Karine Santos², Anke Dienelt², Ferial Azibani¹, Malha Sadoune¹, Paul R. Kounde¹, Jane L. Samuel¹, Heli Tolppanen^{3,4}, Johan Lassus³, Veli-Pekka Harjola⁴, Nicolas Vodovar¹, Andreas Bergmann^{2,5}, Oliver Hartmann^{2,5}, Alexandre Mebazaa^{1,6*}, and Alice Blet^{1,6*}

¹Inserm UMR-S 942, Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT), University of Paris, Paris, France; ²TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany; ³Cardiology, University of Helsinki, Heart and Lung Center, Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland; ⁴Emergency Medicine, University of Helsinki, Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland; ⁵Sphingotec GmbH, Hennigsdorf, Germany; and ⁶Department of Anaesthesiology, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis–Lariboisière, AP-HP, Paris, France

Received 22 July 2019; revised 1 August 2019; accepted 5 August 2019

Aims

Acute heart failure is a high mortality disease and its pathophysiology is not completely understood. Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a cytosolic enzyme involved in angiotensin II and enkephalins cleavage. The aim of this study was to investigate the association of circulating DPP3 (cDPP3) levels and mortality in cardiogenic shock patients and to determine the effects of high cDPP3 on organ function in a heart failure (HF) model in mice.

Methods and results

cDPP3 was measured in 174 patients in cardiogenic shock and high cDPP3 levels were associated with an increased short-term mortality risk (standardized hazard ratio: 1.4 (1.1–1.8)) and severe organ dysfunction. Additionally, a rapid decrease in cDPP3 in cardiogenic shock patients within 24 h of admission was associated with a favourable outcome. This study showed that injection of DPP3 induced myocardial depression ($10 \pm 2\%$ of shortening fraction) and impaired kidney haemodynamics (0.30 ± 0.02 of renal resistive index) in healthy mice. cDPP3 inhibition by Procizumab, a specific antibody directed against cDPP3, promptly normalized cardiac function and kidney haemodynamics in an acute heart failure mouse model, with a marked reduction in oxidative stress and inflammatory signalling.

Conclusion

Our study demonstrated cDPP3 is a newly discovered myocardial depressant factor, the levels of which at admission are associated with mortality in severe HF patients. Furthermore, inhibition of cDPP3 by Procizumab improved haemodynamics in a mouse model of HF. Our results suggest that DPP3 could be a new biomarker and biotarget for severe HF.

Keywords

Acute heart failure • cDPP3 • Biomarkers • Immunotherapy • Procizumab • Antibody •

*Corresponding author. Department of Anaesthesiology, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis–Lariboisière, AP-HP, Paris, France. Tel: +33 1 49 95 80 71, Fax: 33 1 53 21 67 39, Email: alexandre.mebazaa@aphp.fr

[†]These authors equally contributed to this work.

Introduction

Acute heart failure (AHF) is a multifactorial systemic syndrome that is accompanied by cardiac injury. Heart failure (HF) triggers structural, neurohormonal, cellular, and molecular modifications that act together to mitigate HF and restore the heart's physiological function.^{1–3} AHF is associated with a high in-hospital mortality rate ranging from 4% to 30%. However, the pathophysiology of AHF remains poorly understood, particularly at the molecular level, and the therapeutic arsenal remains insufficient regardless of the aetiology of HF. Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a predominantly intracellular ubiquitous zinc-dependent metalloproteinase that is involved in the metabolism of peptides. DPP3 has been implicated in blood pressure regulation,⁴ inflammation,⁵ and pain modulation⁶ by inactivating bioactive peptides through cleavage, notably angiotensin II, enkephalins, and endorphins. Nevertheless, the biological function of DPP3 is poorly understood. Up to now only a few studies have investigated the role and possible clinical effects of circulating DPP3 (cDPP3). In an experimental model of angiotensin II-induced hypertension, Paré et al. demonstrated the in vivo normotensive role of intravenous injection of recombinant DPP3, consistent with the cleavage of angiotensin II by DPP3.⁷ Recently, highly specific assays for the detection of cDPP3 were developed and an association between high levels of plasma cDPP3 activity and mortality in septic patients was reported.⁸ The present study sought to clarify the association between cDPP3 levels and mortality in severe HF patients, and to determine the impact of cDPP3 on cardiac function and kidney haemodynamics, as a proof of concept for DPP3 inhibition as HF therapy.

Methods

Study population

The CardShock study (NCT01374867) has been described previously.¹⁰ Blood samples were processed and stored at -80°C before transfer to the central laboratory for blinded DPP3 measurements [DPP3-luminometric immunoassay (DPP3-LIA), 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany]; levels of cDPP3 in healthy humans are 13 ng/mL .⁹ Routine laboratory analyses (i.e. PaO_2 , lactate, etc.) were performed by the local laboratories of the study centres. The need for cardiovascular support was defined as the requirement for catecholamine during intensive care unit (ICU) hospitalization. Worsening of renal function was defined by an increase in renal Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score between baseline and 48 h.

Animal experimentation

Preclinical studies conformed to the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Lariboisière–Villemain Animal Ethics Committee (0446.03). To respect the ethical Three Rs rules (3Rs), we used the minimum required number of animals for expecting a significant difference. Data collection was stopped in advance when final endpoints were obtained. Outliers, defined before the beginning of the study, were identified using Grubbs' test (extreme studentized deviate test); excluded outliers were not reported. (See Supplementary material online for details.)

Dipeptidyl peptidase 3 injections in healthy mice

Native human DPP3 (hDPP3) was purified from human blood cells as previously described¹ and injected into 3-month-old male C57Bl/6 mice (0.55 mg/kg). Of note, identity between human DPP3 (accession number NP_569710) and mouse DPP3 (accession number NP_001347640) is 93% and similarity is 96% over the entire length of the proteins (737 amino acids). hDPP3- and PBS-injected mice were monitored for 2 h by echocardiography and kidney ultrasound during the procedure before being sacrificed. To limit the impact of serial blood sampling on cardiac and renal function, the half-life of hDPP3 plasma concentrations was performed in different (satellite) mice by collecting 50 μL blood samples before, and 5 min, 5 min, 1 h, and 2 h after DPP3 injection. Two hours post-injection mice were sacrificed for terminal bleeding and the heart was collected for further analysis. DPP3-LIA was used to determine hDPP3 concentrations.

We next spiked healthy human ($n = 2$) and mouse ($n = 2$) fresh heparin-plasma with increased concentrations of hDPP3 to reach concentrations found in the blood of patients with various acute diseases; angiotensins were measured by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). (See Supplementary material online for details.)

Isoproterenol-induced heart failure model

Acute cardiac stress was provoked in 3-month-old C57Bl/6 male mice by subcutaneous injections of 300 mg/kg of isoproterenol (DL-isoproterenol hydrochloride, Sigma Chemical Co; ISO) in 0.9% NaCl (saline) twice daily for 2 days as previously described.⁸ Sham mice ($n = 20$) only received saline. Procizumab (PCZ) (10 mg/kg i.v. $n = 14$) or phosphate-buffered saline (PBS) ($n = 21$) were intravenously injected in mice with isoproterenol-induced cardiac dysfunction assessed by a significant decrease in fractional shortening 12 h after the last isoproterenol injection. Mice were sacrificed 1, 6, or 24 h after injection. For the analysis of long-term effects, isoproterenol-induced HF (ISO-HF) + PBS ($n = 5$) and ISO-HF + PCZ ($n = 5$) mice were observed for 14 days. Heart and kidney function were monitored by echocardiography and kidney ultrasound, respectively. After the animals were sacrificed their organs were collected for analysis.

Procizumab injection in healthy mice

To assess possible effects of PCZ in mice without cardiac dysfunction, we injected the specific inhibitory antibody directly against cDPP3 in 3-month-old male C57Bl/6 male mice ($n = 3$, Sham + PCZ group). Heart function was monitored by echocardiography and 6 h after PCZ injection.

Statistical analysis

CardShock study

Values are expressed as median and interquartile range (IQR), or as count and percentages, as appropriate. Group comparisons of continuous variables were performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Categorical data were compared using Pearson's χ^2 test for count data. cDPP3, lactate, high-sensitivity troponin T (hsTnT), and creatinine data were log-transformed. Cox

proportional-hazard regression was used to assess the association between cDPP3 and survival. For continuous variables, hazard ratios (HRs) were standardized to describe the HR for a biomarker change from quartile 1 to quartile 3. The concordance index (C index) is given as an effect measure. It is equivalent to the concept of area under the curve adopted for binary outcome. Kaplan–Meier plots were used for survival analysis. Correlation was calculated as the Spearman rank correlation (r). A two-sided P -value of 0.05 was considered for significance. The statistical analysis for CardShock was performed using R version 3.61 (<http://www.r-project.org>, library Design, Hmisc, ROCR) and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Experimental studies

Data are presented as mean \pm SD. For two-group comparisons, Wilcoxon signed-rank test or Wilcoxon rank-sum test were used as appropriate. Comparison between more than two groups was performed by repeated measures ANOVA or a Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test, as appropriate. A value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis for experimental studies was performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Circulating dipeptidyl peptidase 3 plasma levels in cardiogenic shock patients

cDPP3 was measured in a cohort of 174 cardiogenic patients (CardShock study) with impaired myocardial function, for whom all-cause mortality follow-up data were available at 90 days. Details of the clinical and the biological parameters of the study population are summarized in Table 1. At admission, median cDPP3 concentration was 33.4 ng/mL (IQR 20.0–65.3). Patients with cDPP3 levels above the median had higher lactate, creatinine, potassium, hsTnT, and lower estimated glomerular filtration rate (eGFR) and left ventricular ejection fraction than those with cDPP3 levels below the median (see Table 1 for details). During the 90-day follow-up period, 72 (4%) patients died. Patients with cDPP3 values at admission greater than the median had higher mortality when compared with those with cDPP3 levels lower than the median (Figure 1A, $P = 0.0001$). Non-survivors had high cDPP3 levels at admission [42.9 ng/mL (IQR 28.4–86.6) vs. 26.5 ng/mL (IQR 17.1–54.9) in survivors, $P = 0.0002$] and at all other time points (Supplementary material online; Figure 3A). Consequently, cDPP3 levels at admission were predictive for 90-day mortality. Yet the C index of cDPP3 was 0.64 [95% confidence interval (CI) 0.57–0.70], $P = 0.0064$; of note, the C indices of other biomarkers at admission were NT-proBNP (0.61), C-reactive protein (0.51), hsTnT (0.57), lactate (0.72), and creatinine (0.66). Cox regression analysis showed an association between cDPP3 at admission and mortality with standardized HR 1.4 (1.1–1.8) (Figure 1B). Interestingly, some patients exhibited marked variations in cDPP3 levels during the first 24 h after admission (Figure 1C, $P < 0.0001$). Patients with a high concentration of cDPP3 at admission but a low concentration at 24 h (high to low group, HL) had a reduced 90-day mortality when compared with patients with high and sustained cDPP3

levels (high to high group, HH). Furthermore, decrease in cDPP3 concentration was associated with a decreased need for cardiovascular support and an improvement of renal function ($P < 0.0001$ and $P = 0.0056$, Figure 1D and 1E). In contrast, patients with low cDPP3 at admission and increased values at 24 h (low to high group, LH) had a marked increase in mortality and greater need for organ support when compared with the patients with low and sustained cDPP3 levels (low to low group, LL; Figure 1C and 1D). Of note, cDPP3 activity very strongly correlated with cDPP3 concentration in the plasma of all patients, regardless of the time point considered ($R^2 = 0.9964$, Supplementary material online; Figure 3B).

Circulating dipeptidyl peptidase 3 injection caused a deterioration in haemodynamics in healthy anaesthetized male mice

In order to assess the direct effects of cDPP3 on cardiovascular function and kidney haemodynamics, purified native human DPP3 (hDPP3)¹¹ was intravenously injected into healthy anaesthetized mice (Figure 2A). Injected hDPP3 had a half-life of about 20 min (Figure 2B) and hDPP3 concentrations returned to low values at 120 min, as previously observed in healthy rats. Injection of hDPP3 provoked a rapid decrease in left ventricular shortening fraction (LVSF 61.6 \pm 2.6% vs. 53.4 \pm 2.0% at baseline, $P = 0.019$), which remained low for 10 min before progressively returning to baseline values at 120 min (Figure 2C). Individual values of shortening fraction between baseline and 5 min after hDPP3 injection are reported in the Supplementary material online; Figure S2. The renal resistive index (RRI), as an estimate of intrarenal haemodynamics, increased 60 min after hDPP3 injection (hDPP3: 0.77 \pm 0.07 vs. Sham: 0.58 \pm 0.06, $P = 0.027$, Figure 2D). LVSF and RRI remained stable in PBS-injected sham mice throughout the experiment. Although LVSF normalized after 20 min, dihydroethidium (DHE) labelling of the myocardium showed a higher reactive oxygen species production in the hearts of hDPP3-injected mice (4.8 \pm 1.3 arbitrary units), when compared with those of sham animals (1.4 \pm 0.7 arbitrary units, $P = 0.0286$, Figure 2E and F). Given the impact of DPP3 on angiotensin II degradation, we measured the angiotensin peptides by mass spectrometry fingerprinting. At baseline, mice had higher levels of angiotensin peptides when compared with humans (Supplementary material online, Table S1). Spiking human and mouse plasma samples with hDPP3 provoked a decrease of all angiotensins tested in both species, although the effect on angiotensin II was more pronounced in human samples (Supplementary material online; Table S1).

Dipeptidyl peptidase 3 pathway in isoproterenol-heart failure mouse model

The protocol for isoproterenol-induced HF (ISO-HF) is summarized in Figure 3A. Twelve hours after the last isoproterenol injection, ISO-HF mice exhibited signs of acute HF with: (i) a decrease in LVSF (47.3 \pm 4.6% vs. 60.1 \pm 3.8%, $P = 0.0012$, Figure 3B) (ii)

Table 1 Patient characteristics from the CardShock study

| Characteristics | All (n = 174) | DPP3, below median (n = 88) | DPP3, above median (n = 86) | P-value |
|---|------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------|
| DPP3 (pmol/L) | 33.4 [20–65.3] | [0–33.4] | [33.4–886.5] | — |
| Age (years) | 67 [60–75] | 67 [61–77] | 67 [57–73] | 0.3161 |
| Women; n(%) | 47 (27.0) | 26 (29.5) | 21 (24.4) | 0.5547 |
| BMI; mean (SD) | 26.7 [24.2–29.4] | 26.6 [24.2–29.07] | 27.05 [24.2–29.7] | 0.6386 |
| Medical history, n (%) | | | | |
| Coronary artery disease | 51 (29.3) | 24 (27.3) | 27 (31.4) | 0.6666 |
| Previous myocardial infarction | 45 (25.9) | 2 (23.9) | 24 (27.9) | 0.6630 |
| Previous PCI | 29 (16.7) | 13 (14.8) | 16 (18.6) | 0.6350 |
| Previous CABG | 11 (6.3) | 6 (6.8) | 5 (5.8) | 0.9686 |
| Heart failure | 29 (16.7) | 14 (15.9) | 15 (17.4) | 0.9459 |
| IHD | 59 (33.9) | 26 (29.5) | 33 (38.4) | 0.2848 |
| Hypertension | 104 (59.8) | 50 (56.8) | 54 (62.8) | 0.5166 |
| Diabetes | 52 (29.9) | 28 (31.8) | 24 (27.9) | 0.6907 |
| Asthma/COPD | 19 (10.9) | 10 (11.4) | 9 (10.5) | 0.9577 |
| Renal insufficiency | 22 (12.6) | 9 (10.2) | 13 (15.1) | 0.4581 |
| Stroke/TIA | 16 (9.2) | 10 (11.4) | 6 (7) | 0.4600 |
| Smoker | 70 (40.5) | 36 (41.4) | 34 (39.5) | 0.9265 |
| Clinical presentation | | | | |
| Blood pressure (MAP; mmHg) | 57 [50–63] | 57 [52–61] | 57 [48–66.5] | 0.7125 |
| Heart rate at enrolment (beats/min) | 90 [70–110] | 89 [71–110] | 90 [69–110] | 0.6999 |
| Rhythm at enrolment, n (%) | | | | |
| Sinus rhythm | 125 (72.7) | 68 (77.3) | 57 (67.9) | 0.2248 |
| Atrial fibrillation. Other | 26 (15.2) | 13 (14.8) | 13 (15.7) | 0.9593 |
| Baseline echocardiography | | | | |
| LVEDD (mm) | 51 [47–56] | 51 [46–55] | 52 [48.75–57.25] | 0.1153 |
| LVEF (%) | 30 [20–42] | 35 [20.75–45] | 28 [20–35] | 0.0196 |
| Biochemistry | | | | |
| Hb (g/dL) | 13.1 [11.2–14.4] | 13.2 [11.1–14.5] | 13.0 [11.5–14.1] | 0.9244 |
| Sodium (mmol/L) | 137 [134–140] | 138 [134–140] | 136 [133–139] | 0.1638 |
| Potassium (mmol/L) | 4.1 [3.8–4.6] | 3.9 [3.7–4.24] | 4.3 [3.83–5] | 0.0010 |
| Lactate (mmol/L) | 2.8 [1.8–5.8] | 2.3 [1.4–3.3] | 4 [2.3–7.5] | <0.0001 |
| pH | 7.30 [7.22–7.40] | 7.33 [7.24–7.4] | 7.3 [7.21–7.4] | 0.4185 |
| hsTnT (ng/mL) | 2120 [386–5313] | 1166 [285–3795] | 2750 [976–8716] | 0.0028 |
| NT-proBNP (pg/mL) | 2782 [631–9657] | 2067 [676–8299] | 3706 [590–11 623] | 0.2286 |
| Creatinaemia (μmol/L) | 103 [78–141] | 97 [80–123] | 115 [89–168] | 0.0069 |
| eGFR (mL/min) | 61 [40–86] | 67.2 [43.5–89.3] | 54.9 [32.2–75.4] | 0.0119 |
| CRP (mg/L) | 17 [4–53] | 13 [3–43] | 22.4 [1–97] | 0.4476 |
| Use of vasoactive medication during the first 96 h from detection of shock, n (%) | | | | |
| Epinephrine | 28 (17.1) | 6 (7) | 22 (28.2) | 0.0007 |
| Norepinephrine | 129 (75.4) | 66 (75.9) | 63 (75) | 0.9627 |
| Dopamine | 29 (17.2) | 10 (11.6) | 19 (22.9) | 0.0823 |
| Dobutamine | 92 (54.4) | 39 (45.3) | 53 (63.9) | 0.0238 |
| Levosimendan | 46 (27.1) | 24 (27.9) | 22 (26.2) | 0.9369 |
| Management and outcomes, n (%) | | | | |
| Trombolysis | 16 (9.4) | 8 (9.3) | 8 (9.4) | 0.8119 |
| Angiogram | 130 (90.9) | 66 (86.8) | 64 (95.5) | 0.1310 |
| PCI | 117 (67.6) | 59 (67.8) | 58 (67.4) | 0.9125 |
| Mechanical haemodynamics support | | | | |
| IABP | 96 (55.2) | 45 (51.1) | 51 (59.3) | 0.3521 |
| LVAD | 6 (3.5) | 2 (2.3) | 4 (4.8) | 0.6459 |
| ECMO | 3 (1.8) | 0 (0) | 3 (3.6) | 0.2276 |
| Admission ICU/CCU | 63 (36.2) | 33 (37.5) | 30 (34.9) | 0.8405 |
| RRT | 19 (11.2) | 8 (9.3) | 11 (13.1) | 0.5883 |

Table 1 Continued

| Characteristics | All (n = 174) | DPP3, below median (n = 88) | DPP3, above median (n = 86) | P-value |
|---------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------|
| Surgery | | | | |
| CABG | 6 (3.5) | 3 (3.4) | 3 (3.6) | 0.7100 |
| Valvular surgery | 7 (4.1) | 4 (4.6) | 3 (3.6) | 0.9622 |
| Other major surgery | 14 (8.2) | 7 (8.1) | 7 (8.3) | 0.8157 |
| 90-day mortality | 72 (41.4) | 23 (26.1) | 49 (57) | 0.0001 |

Values are expressed as median and interquartile range (IQR), or as count and percentages, as appropriate. Group comparisons of continuous variables were performed using the Kruskal–Wallis test. Categorical data were compared using Pearson's χ^2 test. Circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3), lactate, high-sensitivity troponin T (hsTnT), and creatinine data were log-transformed. All statistical tests were two-tailed and a two-sided *P* value of 0.05 was considered for significance. BMI, body mass index; CABG, coronary artery bypass grafting; CCU, critical care unit; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CRP, C-reactive protein; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; eGFR, estimated glomerular filtration rate; Hb, haemoglobin; hsTnT, high-sensitivity troponin T; IABP, intra-aortic balloon pump; ICU, intensive care unit; IHD, ischaemic heart disease; LVAD, left ventricular assist device; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; MAP, mean arterial pressure; NT-proBNP, N-terminal pro brain natriuretic peptide; PCI, percutaneous coronary intervention; RRT, renal replacement therapy; TIA, transient ischaemic attack.

a decrease in cardiac output (CO) (13.11 ± 2.15 mL/min vs. 22.65 ± 6.58 mL/min, $P = 0.0177$, Supplementary material online, Figure S3A) (iii) lung congestion (lung weight: 9.85 ± 1.32 mg/mm tibia length vs. 7.96 ± 1.02 mg/mm tibia length, $P = 0.0293$, Supplementary material online, Figure S3B) (iv) an increase in E/A wave mitral ratio (1.46 ± 0.19 vs. 1.23 ± 0.12 , $P = 0.0303$, Supplementary material online, Figure S3C) and (v) an increase in RRI (0.73 ± 0.14 vs. 0.53 ± 0.09 , $P = 0.0183$, Figure 3C). Importantly, cDPP3 activity was markedly increased in the plasma of ISO-HF mice when compared with sham animals (156 ± 19 U/L vs. 22.1 ± 5.1 U/L, $P = 0.0423$, Figure 3D). Furthermore, cardiac DPP3 mRNA and protein levels were higher in ISO-HF mice when compared with sham mice (0.96 ± 0.16 arbitrary units vs. 0.62 ± 0.17 arbitrary units, $P = 0.0159$ and 1.16 ± 0.65 arbitrary units vs. 0.69 ± 0.65 arbitrary units, $P = 0.0317$, respectively; Supplementary material online, Figure S3D and S3E).

Benefits of procizumab injection in heart failure model in mice

PCZ injection rapidly normalized the LVSF of ISO-HF+ PCZ mice within 1 h after injection when compared with ISO-HF+ PBS group ($60.7 \pm 4.36\%$ vs. $48.1 \pm 3.96\%$, $P = 3.32 \times 10^{-7}$, Figure 3E); LVSF remained normal at 24 h (Figure 3E) and 14 days after the single initial PCZ injection in ISO-HF+ PCZ mice (Supplementary material online, Figure S3F). PCZ also improved stroke volume and CO in ISO-HF+ PCZ mice within 6 h (Figure 3F). The injection of a non-active IgG had no effect on LVSF in ISO-HF mice and values were similar to those of the ISO-HF+ PBS at day 8 and day 14 (Supplementary material online, Figure S3F). Supplementary material online, Figure S4A shows individual values of shortening fraction before and 1 h after PCZ injection in the ISO-HF+ PCZ group. Concerning renal haemodynamics, RRI decreased towards normal values at 6 and 24 h in ISO-HF+ PCZ animals whereas it remained unchanged in ISO-HF+ PBS mice (0.66 ± 0.14 vs. 0.81 ± 0.15 , $P = 0.073$, Figure 3G). RRI remained stable throughout the experiment in sham mice. In addition to the improvement in haemodynamics, PCZ rapidly reduced oxidative stress in the heart of

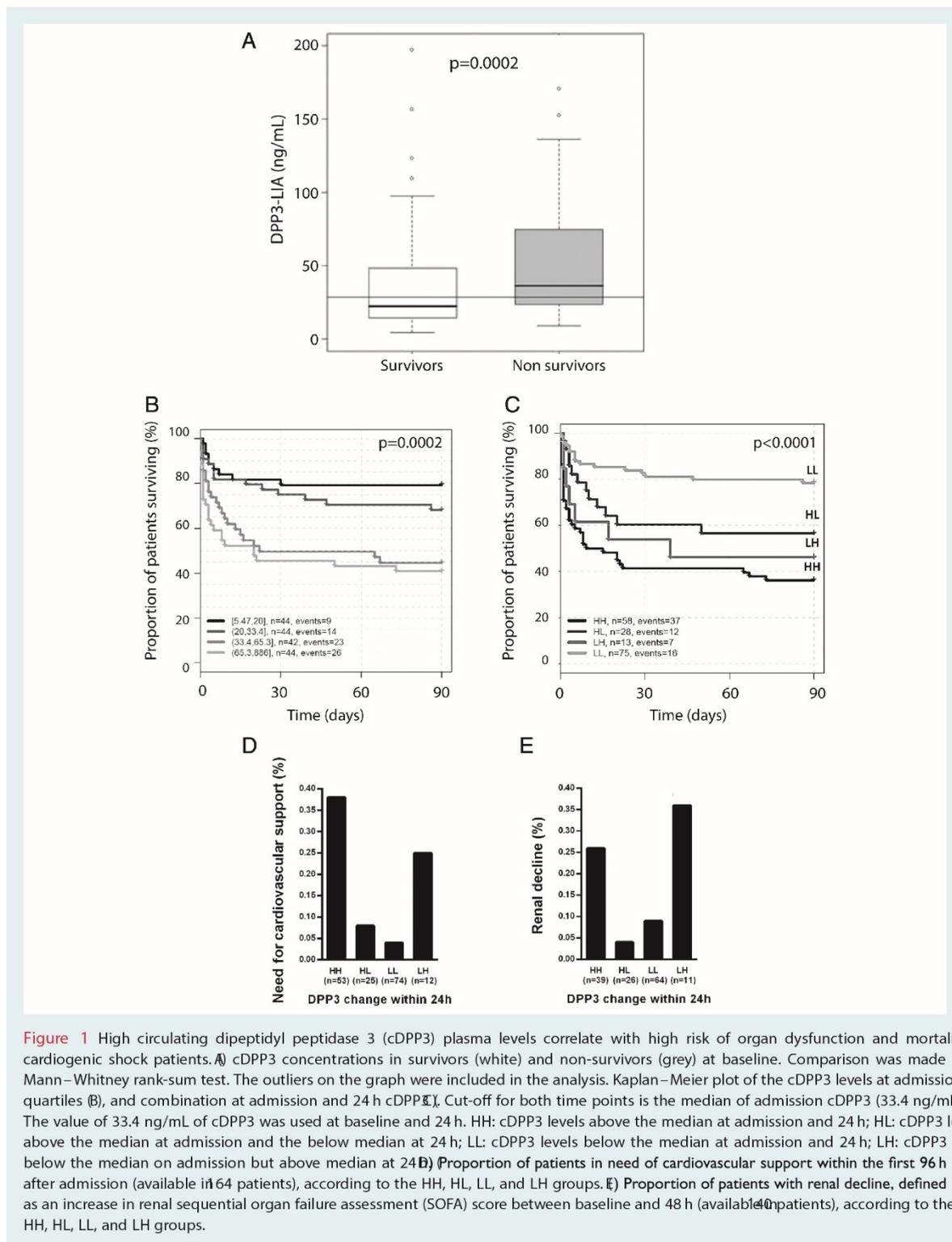
ISO-HF+ PCZ mice when compared with those of ISO-HF+ PBS animals (2.61 ± 1.02 AU vs. 9.30 ± 1.88 AU at 1 h, $P = 0.0286$) (Figure 3H and 3I). LVSF was not modified in the Sham+ PCZ group compared with Sham+ PBS, 1 h and 6 h after PCZ injection ($P = 0.9554$, Supplementary material online, Figure S4B). Supplementary material online, Figure S4C shows exemplary pictures of echocardiography and renal Doppler in the ISO-HF+ PCZ group (baseline, day 3 and 24 h after PCZ injection).

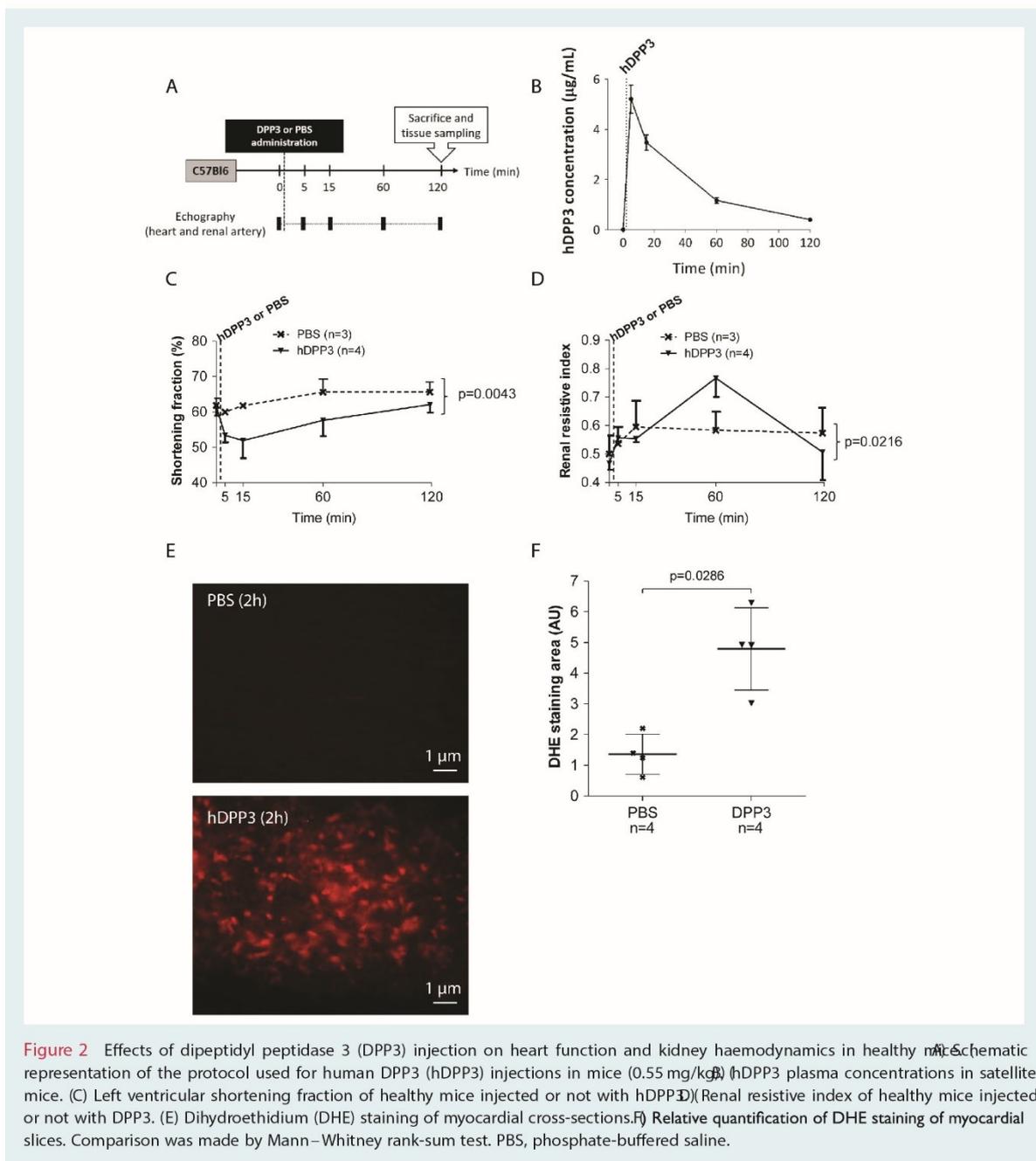
Discussion

Our study demonstrated that DPP3, a cytosolic enzyme, is a newly myocardial depressant factor, the plasma levels of which at admission are associated with mortality in patients with cardiogenic shock. Additionally, in preclinical studies, excess cDPP3 provoked cardiac depression, associated with alteration in inflammation pathway and angiotensin peptide concentrations, while cDPP3 inhibition improves cardiac contraction in a mouse model of HF.

The ISO-HF mouse model was chosen to better mimic the pathophysiology of acute HF and evaluate the impact of cDPP3 blockade on cardiac function and kidney haemodynamics. This model exhibits cardiac dysfunction and diffuse cellular necrosis^{31,35} as observed during cardiogenic shock. Since cDPP3 is elevated in severe HF and in the ISO-HF model, specific inhibition of cDPP3 was tested *in vitro* by various mouse monoclonal antibodies raised against the protein, resulting in the selection of PCZ, which was later humanized (Supplementary material online, Figure S5). Crystal structures of hDPP3 in apo and substrate-bound forms show that the enzyme undergoes a large conformational change between the open (apo) state and the closed (substrate-bound state). PCZ binds to a conserved loop in the vicinity of the active site that remains accessible in both the open and closed states, therefore likely precluding the transition between cDPP3 catalytic states and therefore inhibiting its enzymatic activity.

Using PCZ, our study demonstrated the key role of cDPP3 in altered haemodynamics in acute HF in mice. Indeed, cDPP3 inhibition by PCZ was associated with improved cardiac contraction and kidney haemodynamics. In the present study, the





benefits of PCZ are in line with detrimental effects seen with hDPP3 intravenous injection both herein and in a previous study showing that cDPP3 reduced blood pressure. In the CardShock study, the striking detrimental association between high cDPP3, related to cellular necrosis from the heart and/or from other injured organs, and survival suggests that the negative effects of high cDPP3 in our patients might include worsening in both

haemodynamics and tissue injury. This is supported by the great need for cardiovascular support and/or the marked renal decline seen in our Cardiogenic patients patients with persistent high cDPP3. Our clinical data are in agreement with results from the OptimaCC study¹⁸ demonstrating that high levels of cDPP3 levels in cardiogenic shock patients, after acute myocardial infarction, are associated with low cardiac index and high occurrence of

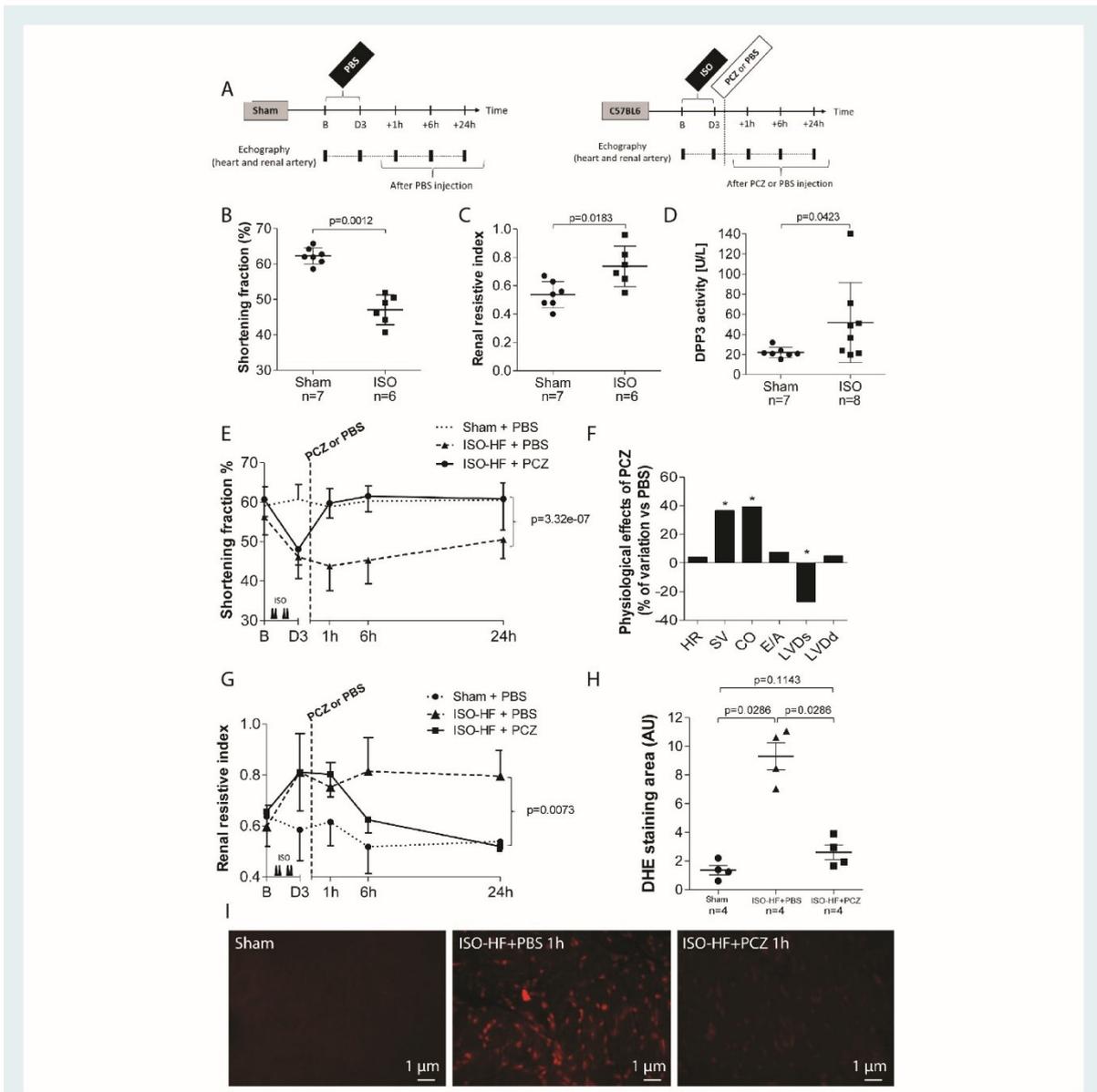


Figure 3 Procizumab rapidly and sustainably improves haemodynamics in isoproterenol-injected (ISO) mice. **A** Schematic representation of the protocol used to provoke heart failure in mice. **B** Left ventricular shortening fraction of sham and ISO mice at day 3, 1h after the last isoproterenol injection. Comparison was made by Mann-Whitney rank-sum test. **C** Renal resistivity of sham and ISO mice at day 3, 1h after the last isoproterenol injection. Comparison was made by Mann-Whitney rank-sum test. **D** Plasma mouse circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) activity in sham and ISO mice. **E** Left ventricular shortening fraction in sham phosphate-buffered saline (PBS) (n = 5), isoproterenol-induced heart failure (ISO-HF) + PBS (n = 5) and ISO-HF + procizumab (PCZ) (n = 5) mice until 24 h after treatment. Comparison was made by repeated measures ANOVA. **F** Difference between ISO-HF + PBS and ISO-HF + PCZ groups in haemodynamics 6 h after PCZ or PBS injection. $P < 0.05$ between ISO + PBS and ISO + PCZ groups). **G** Renal resistive index in sham + PBS (n = 5), ISO-HF + PBS (n = 5) and ISO-HF + PCZ (n = 5) mice 24 h after PCZ or PBS injection. Comparison was made by repeated measures ANOVA. **H** Quantification of myocardial dihydroethidium (DHE) labelling. Comparison was made by Mann-Whitney rank-sum test. **I** DHE labelling of cardiomyocytes from sham and ISO-HF + PBS and ISO-HF + PCZ mice. CO, cardiac output; E/A, mitral Doppler wave; HR, heart rate; LVDd, left ventricular diameter in diastole; LVDs, left ventricular diameter in systole; SV, stroke volume.

refractory shock and impaired kidney function. Accordingly, our data support the need to assess the benefits of PCZ to restore haemodynamics and to improve outcome in acute HF patients.

Our data provide solid evidence of a central role for DPP3 in the pathophysiology of cardiac dysfunction. Mechanisms of DPP3-induced myocardial depression are unknown and need further exploration. Our work shows that both the DPP3 depressant myocardial effects and the benefits of its inhibition by PCZ on contractile function are rapid. An alternative explanation is the rapid effect of DPP3 on the metabolism of cardiovascular peptides with known cardiovascular properties. The present study shows incremental and striking, especially in humans, reduction of angiotensins with increasing concentration of DPP3. Further studies should assess whether circulating enkephalins, another well-known substrate of DPP3 with positive inotropic properties,^{9,20} are affected by excess cDPP3. Future studies also need to address these cardiovascular mediators in vivo during DPP3 or PCZ infusion.

Our study has some limitations. First, we studied the effect of PCZ in a unique model of HF. However, the combination of both human and preclinical study was designed to provide a proof of concept of cDPP3 as a possible biomarker and therapeutic target in HF. Our results would need confirmation in other preclinical models of HF,⁹ especially in sepsis that combines cardiovascular dysfunction and excess inflammation, which is beyond the proof of concept design of this study. Second, the number of tested animals was rather low. However, with respect to the main results section, individual data showed that cDPP3 (reduction in shortening fraction) and PCZ (improvement in shortening fraction) effects were similar in all tested animals. Although performed in the plasma of two mice, *in vitro* experiments showed that high concentrations of DPP3 led to a reduction of plasma concentration of all angiotensin peptides. Additionally, a similar effect was observed in human plasma. Our preclinical data are a proof of concept study and the results require confirmation in large animal models. In addition, cardiac and vascular haemodynamic measurements and further biological analyses should be performed in future preclinical studies to better understand the mechanism(s) of action of PCZ. Thirdly, the biological effects of cDPP3 inhibition by PCZ are not completely understood and deserve more detailed analyses. In particular, measurements of mediators of the renin-angiotensin-aldosterone system should be performed in a large number of animals and humans in the presence or absence of PCZ and of angiotensin II receptor blockers. Lastly, prognostic properties of cDPP3 in CS need confirmation in large cohorts in order to assess added values compared with previously described clinical and biological severity scores.

In conclusion, our study suggests that cDPP3, when elevated in the plasma, could be a potential myocardial depressant factor associated with high mortality and organ dysfunction in severe HF patients and in a mouse model of HF. Future studies should compare the prognostic properties of cDPP3 and other biomarkers usually used in severe and/or advanced HF, namely troponin or natriuretic peptides. Our study further showed that inhibition of cDPP3 by PCZ promptly and sustainably restored cardiac contraction in HF in mice. Mechanisms of PCZ action and confirmation of its favourable effects on haemodynamics in large animal models and

in humans are needed in order to propose it as a novel therapy in severe heart failure.

Supplementary Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. ISO, isoproterenol; Analysis of cDPP3 concentrations at admission, 12 h, 24 h, 48 h and 120 h after admission in plasma of cardiogenic shock patients. **A)** cDPP3 concentrations measurements via LIA of 90-day survivors vs. non-survivors at baseline, 12 h, 24 h, 48 h and 120 h. In order to have identical patient numbers for each box, missing data were replaced by carrying the last observed value forward. **B)** Correlation curve between DPP3 activity measurements via ECA and DPP3 concentration measurements via LIA ($r > 0.99$, $P < 0.001$).

Figure S2. Individual data on the shortening fraction of mice before and 15 min after cDPP3 injection. Comparison was made by Mann-Whitney test, $P < 0.05$ was considered significant.

Figure S3. ISO, isoproterenol; Characterization of HF mice model and effect of PCZ on cardiac function until 4 days of ISO protocol. **(A)** Cardiac output in sham and isoproterenol-injected (ISO) mice 12 h after the last injection of isoproterenol. Comparison was made by Mann-Whitney test. **(B)** Lung weight on tibia length rapport in sham and isoproterenol-injected (ISO) mice 12 h after the last injection of isoproterenol. Comparison was made by Mann-Whitney test. **(C)** E/A ratio in sham and isoproterenol injected (ISO) mice 12 h after the last injection of isoproterenol. Comparison was made by Mann-Whitney test. **(D)** mRNA DPP3 in heart of sham and isoproterenol-injected (ISO) mice 12 h after the last injection of isoproterenol. Comparison was made by Mann-Whitney test. **(E)** DPP3/GADPH immunoblot in heart of sham and isoproterenol-injected (ISO) mice 12 h after the last injection of isoproterenol. Comparison was made by Mann-Whitney test. **(F)** Evolution of shortening fraction after isoproterenol injection and PBS injection (vertical dotted line, $n = 5$), PCZ ($n = 5$) and non-active IgG ($n = 3$) at day 3. Mice were monitored during 4 days after the beginning of isoproterenol injection with haemodynamics point at day 8 and 14. Animals were sacrificed at day 14.

Figure S4. ISO, isoproterenol; Cardiac and renal effects of PCZ in ISO-HF mice. **(A)** Individual data on the shortening fraction of ISO-HF + PCZ mice before and 1 h after PCZ injection. Comparison was made by Wilcoxon paired test. **(B)** Evolution of shortening fraction in Sham+ PBS and Sham+ PCZ group, 1 and 6 h after injection of PBS or PCZ. Comparison was made by repeated measures of ANOVA, data shown as mean \pm SD. **(C)** Isoproterenol protocol and images from echocardiography and kidney ultrasound at baseline, day 3 after the beginning of ISO injection and 24 h after the last injection of isoproterenol and 24 h after PCZ injection in mice. (HF: heart failure, ISO: isoproterenol, PCZ: Procizumab.)

Figure S5. ISO, isoproterenol; Characterization of DPP3 inhibiting antibody PCZ. **(A)** Binding sensogram of the captured PCZ interacting with GST-hDPP3 (3.7, 11.1, 33 and 100 nM dilutions) and 1:1 kinetic model fit overlays in the Octet RED96. Only

association and dissociation steps are shown, divided by a vertical line. The processed data curves represent non-linear regression fits from 1:1 binding model and global analysis. Global fitting results: $k_a = 8.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_d = 8.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ yielding a $KD = 9.6 \text{ nM}$. Goodness of fit $R^2 = 0.9994$. (B) Western blot specificity analysis of PCZ in human (hBCL) and murine blood cell lysates, heart, and kidney homogenates (mBCL). PCZ identifies a single band between 75 and 80 kDa in western blot. As control, human DPP3 natively purified from blood cell lysate was used (hDPP3). (C) Inhibition curve of PCZ with natively purified hDPP3. DPP3 inhibition by PCZ was investigated using the SAA assay in the presence of a fluorogenic substrate. PCZ binds hDPP3 and inhibits hDPP3 cleavage of Arg⁷-PNA, leading to reduced fluorescence. Non-linear regression fitting resulted in $IC_{50} = 7.05 \mu\text{g/mL}$ and $I_{max} = 73.3\%$.

Table S 1. Angiotensin levels in human and mice plasma.

Acknowledgements

We thank Dr P. Bonnin (UMR-S 1165, Lariboisière Hospital) for thorough methodological assistance, E. Polidano (UMR-S 942, Lariboisière Hospital) for technical assistance, Dr C. Delcayre (UMR-S 942, Lariboisière Hospital), Prof. J.M. Launay (UMR-S 942, Lariboisière Hospital), Dr Antoine Kimmoun and Dr R. Fischmeister (UMR-S 1180, Lariboisière Hospital) for valuable discussion about the global project.

Funding

The CardShock study was supported by grants from the Aarne Koskelo Foundation and the Finnish Cardiac Foundation (Helsinki, Finland). hDPP3 and Procizumab were provided by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH received funding from the Investitionsbank des Landes Brandenburg (ILB). **Conflict of interest:** A.M. reports personal fees from Novartis, Orion, Roche, Servier, Sanofi, Otsuka, Philips, grants and personal fees from Adrenomed, Abbott, and grants from 4TEEN4. In addition A.M. owns fewer than 3000 euros shares of S-Form Pharma company. B.D. and A.B.I. were invited to a meeting in Henningsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. K.S. and A.D. are employed at 4TEEN4 Pharmaceuticals. A.B. is CEO and shareholder at 4TEEN4 Pharmaceuticals. 4TEEN4 owns intellectual properties related to the therapeutic use of DPP3 inhibitors and diagnostic use of DPP3. The remaining authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research authorship and/or publication of this article.

References

- Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail* 2013;1:1–20.
- Gutierrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elizaga J, Lerman A, Fernandez-Aviles F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *Eur Heart J* 2013;34:3175–3181.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJV, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WHW, Tsai EJ, Wilkoff BL. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Am Coll Cardiol* 2013;62:e147–e239.
- Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, Nodari S, Lam CSP, Sato N, Shah AN, Gheorghiu M. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure. *Am Coll Cardiol* 2014;63:1123–1133.
- Zhan H, Yamamoto Y, Shumiya S, Kunimatsu M, Nishi K, Ohkubo I, Kani K. Peptidases play an important role in cataractogenesis: an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats. *Histochem J* 2001;33:511–521.
- Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* 2011;278:3256–3276.
- Pang X, Shimizu A, Kurita S, Zankov DP, Takeuchi K, Yasuda-Yamahara M, Kume S, Ishida T, Ogita H. Novel therapeutic role for dipeptidyl peptidase III in the treatment of hypertension. *Hypertension* 2016;68:630–641.
- Dale CS, Pagano RL, Rioli V. Hemopressin: a novel bioactive peptide derived from the alpha-chain of hemoglobin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:105–106.
- Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergmann A. Novel methods for the quantification of dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) concentration and activity in human blood samples. *Appl Lab Med* November 2018. doi: 10.1373/jalm.2018.027995.
- Harjola V-P, Lassus J, Sionis A, Køber L, Tarvasmäki T, Spinar J, Parissis J, Banaszewski M, Silva-Cardoso J, Carubelli V, Di Somma S, Tolppanen H, Zeymer U, Thiele H, Nieminen MS, Mebazaa A; CardShock Study Investigators; GREAT Network. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2015;17:501–509.
- Kaufman P, Muenzner M, Kästorf M, Santos K, Hartmann T, Dienelt A, Rehfeld L, Bergman A. A novel and highly efficient two-step purification procedure for native human dipeptidyl peptidase 3 from human blood cell lysates. *Sci One* 2019;14:e0220866.
- Vergaro G, Prud'homme M, Fazal L, Merval R, Passino C, Emdin M, Samuel J-L, Cohen Solal A, Delcayre C. Inhibition of galectin-3 pathway prevents isoproterenol-induced left ventricular dysfunction and fibrosis in mice. *Hypertension* 2016;67:606–612.
- Bloom S, Davis DL. Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1972;69:459–470.
- Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* 2009;59:339–343.
- Hasić S, Jadrě R, Kiseljaković E, Mornjaković Z, Winterhalter-Jadrić M. Troponin T and histological characteristics of rat myocardial infarction induced by isoproterenol. *Bosn J Basic Med Sci* 2007;7:212–217.
- Thiele H, Zeymer U, Neumann F-J, Ferenc M, Olbrich H-G, Hausleiter J, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Fuhrmann J, Böhm M, Ebel H, Schneider S, Schuler G, Werdan K; IABP-SHOCK II Trial Investigators. Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N Engl J Med* 2012;367:1287–1296.
- Kumar P, Reithofer V, Reisinger M, Wallner S, Pavkov-Keller T, Macheroux P, Gruber K. Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Sci Rep* 2016;6:23787.
- Takagi K, Blet A, Levy B, Deniau B, Azibani F, Féliot E, Bergman A, Rehfeld L, Santos K, Dienelt A, Hartmann O, Mebazaa A, Kimmoun A. Circulating dipeptidyl-peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial. *Eur J Heart Fail* 2019, in press. doi: 10.1002/ejhf.1600.
- Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garcarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camiliónde Hurtado MC, Aiello EA. The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin and reactive oxygen species. *Hypertension* 2006;47:727–734.
- Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S. Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *Eur J Pharmacol* 1978;50:17–25.

3. Discussion

Grâce à ce travail, nous démontrons que la DPP3, une enzyme cytosolique, est un FDM dont les taux plasmatiques à l'admission des patients en réanimation pour choc cardiogénique étaient associés à la mortalité. De plus, chez la souris saine, l'injection de DPP3 induisait une dépression myocardique associée à une libération excessive d'espèces réactives de l'oxygène myocardique et à une diminution des taux d'angiotensines. L'inhibition de la DPP3 par un anticorps spécifique, le Procizumab, améliorait la contraction myocardique dans un modèle de choc cardiogénique à l'isoprénaline chez la souris.

Le modèle de choc cardiogénique induit par des injections répétées d'isoprénaline a été choisi dans notre étude pour mimer la physiopathologie de l'IC aiguë et évaluer le bénéfice du blocage de la DPP3 circulante sur la fonction cardiaque et l'hémodynamique rénale. Ce modèle est caractérisé par une dysfonction cardiaque importante et une nécrose cardiomyocytaire diffuse (310–312), comme observées au cours du choc cardiogénique (55). En utilisant le Procizumab dans notre travail, nous avons démontré le rôle clé de la DPP3 dans la dépression myocardique et l'altération de l'hémodynamique rénale au cours de l'IC aiguë. Les bénéfices de l'injection du Procizumab sont en accord avec les effets délétères observés suite à une injection de hDPP3 réalisés dans ce travail, mais aussi avec la baisse de pression artérielle observée dans un travail précédent suite à une injection de DPP3 (282). Les résultats de l'étude CardShock sont similaires à ceux de l'étude OptimaCC dans laquelle des taux élevés de DPP3 circulante au cours du choc cardiogénique d'origine ischémique étaient associés à un index cardiaque plus bas et une survenue plus fréquente de choc cardiogénique réfractaire (297). Toutes ces données laissent à penser que l'utilisation du Procizumab au cours de l'IC aiguë, en bloquant l'excès de DPP3 circulante, pourrait permettre d'améliorer le pronostic des patients.

Nos données démontrent clairement le rôle central de la DPP3 dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque. Les mécanismes exactes par lesquels la DPP3 induit une dépression myocardique ne sont pas encore connus et nécessitent des explorations supplémentaires. L'hypothèse d'une

diminution rapide des peptides à tropisme cardiovasculaire, notamment des angiotensines et des enképhalines(313, 314), par la DPP3 relarguée au cours de la nécrose cellulaire est la plus probable.

Notre travail présente plusieurs limites. Premièrement, nous avons étudié les effets de l'injection du Procizumab dans un seul modèle de défaillance cardiaque aiguë chez la souris. Notre étude, qui associait des résultats cliniques avec des résultats expérimentaux, est une preuve de concept de la possibilité d'utilisation de la DPP3 comme biomarqueur au cours du choc cardiogénique mais aussi des bénéfices thérapeutiques d'une injection de Procizumab. Nos résultats nécessitent d'être confirmés par d'autres études utilisant d'autres modèles expérimentaux d'IC, et notamment septique car elle résulte de la combinaison d'une dysfonction cardiovasculaire avec une inflammation importante. Deuxièmement, le nombre d'animaux inclus dans notre étude est relativement faible. Les effets d'une injection unique de hDPP3 (réduction de la fraction de raccourcissement) ou d'une injection de Procizumab au cours d'une IC aiguë (récupération rapide d'une fonction systolique normale) sont identiques chez tous les animaux étudiés. Dans un souci de respect des règles éthiques propres à l'utilisation des animaux à des fins expérimentales et notamment de la règle des 3R, nous avons décidé de limiter le nombre d'animaux inclus dans chaque groupe. Ces résultats nécessitent donc d'être confirmés par des études de plus larges effectifs, incluant notamment d'autres mesures hémodynamiques et d'analyses biologiques pour expliquer l'implication physiopathologique de la DPP3 dans la dépression myocardique. Troisièmement, les effets biologiques précis de la DPP3 ne sont pas clairement élucidés et nécessitent des explorations complémentaires, notamment des mesures des différents peptides du SRAA qui doivent être réalisées dans des études précliniques et cliniques incluant un plus grand nombre d'individus. Enfin, les propriétés pronostiques de la DPP3 au cours du choc cardiogénique doivent être confirmées dans des cohortes incluant un nombre plus important de patients dans le but d'évaluer la plus-value de ce nouveau biomarqueur par rapport aux autres biomarqueurs et aux scores de gravité couramment utilisés en réanimation dans cette pathologie.

En conclusion, notre étude suggère que lorsque les taux plasmatiques de la DPP3 sont élevés, elle pourrait être un FDM. De plus, une élévation de ses taux plasmatiques est associée à une mortalité plus élevée et une survenue plus fréquente de défaillances d'organes chez les patients présentant une IC aiguë. Ces résultats sont confirmés dans un modèle d'IC aiguë à l'isoprénaline chez la souris. Les études futures doivent comparer les propriétés pronostiques que la DPP3 avec les autres biomarqueurs habituellement utilisés au cours de l'IC aiguë, notamment la troponinémie et les peptides natriurétiques. Enfin, notre travail démontre clairement que l'inhibition de la DPP3 par un anticorps spécifique (le Procizumab), normalise rapidement et durablement la contraction cardiaque chez la souris présentant une IC aiguë à l'isoprénaline. Les mécanismes d'action du Procizumab et ses potentiels effets bénéfiques doivent être confirmés par des études animales de plus larges effectifs. Des études cliniques sont nécessaires dans le but de proposer le Procizumab comme nouveau traitement de l'IC aiguë.

Article 3

Circulating dipeptidyl-peptidase 3 inhibition restores cardiac function
in a sepsis-induced model in rats: a proof of concept study

Rôle de DPP3 dans la défaillance cardiaque d'origine septique chez le rat

1. Introduction

Le sepsis est défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital causée par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection (60). Il s'agit d'un véritable problème de Santé Publique qui touche plusieurs millions de personnes chaque année dans le monde (60). Le choc septique, la forme la plus grave du sepsis, est défini comme un sepsis associé une lactatémie supérieure à 2 mmol/L nécessitant des drogues vasopressives pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg malgré un remplissage vasculaire adapté (60). Le choc septique est caractérisé par une mortalité élevée, notamment en cas de dysfonction cardiaque (70, 81). Bien que la physiopathologie du sepsis repose principalement sur une inflammation excessive et une immunosuppression, les mécanismes précis des dysfonctions d'organes, notamment cardiaque, sont aujourd'hui inconnus (59, 68).

La DPP3 est une enzyme ubiquitaire principalement impliquée dans le clivage de l'angiotensine 2 en angiotensine 4 (206, 282). L'ensemble des fonctions biologiques de la DPP3 sont inconnues. Nous avons montré dans un travail précédent que les taux de DPP3 circulants étaient élevés chez les patients atteints de choc cardiogénique réfractaire et étaient associés à un pronostic sombre (302). Précédemment, il a été démontré que les patients septiques avaient des taux de DPP3 plus élevés que les volontaires sains (301). L'association entre des taux élevés de DPP3 et la mortalité ou la survenue de dysfonctions d'organes chez les patients septiques n'a jamais été étudiée à ce jour.

Nous avons précédemment démontré le rôle dépresseur myocardique de la DPP3 en l'injectant chez la souris saine (302). De plus, l'inhibition de la DPP3 dans un modèle de défaillance cardiaque aiguë par le Procizumab, un anticorps spécifique de la DPP3, permettait d'améliorer rapidement et durablement la dysfonction cardiaque. Etant donné que les taux de DPP3 sont élevés dans le plasma de patients septiques, nous avons émis l'hypothèse que le Procizumab, un anticorps inhibant spécifiquement le DPP3, pouvait améliorer la dysfonction cardiaque d'origine septique.

L'objectif de ce travail était d'évaluer le bénéfice du blocage de la DPP3 par le Procizumab au cours de la défaillance cardiaque aiguë d'origine septique chez le rat.

2. Publication (en cours de soumission dans *Shock*)

Circulating dipeptidyl-peptidase 3 inhibition restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats:

a proof of concept study

DENIAU Benjamin^{1,2}, BLET Alice^{1,2}, SANTOS Karine⁴, GENEST Magali², REHFELD Linda⁴,

VATTANAIDA AYA Prabakar^{2,3,5}, SADOUNE Malha², DE SOUSA JORGE Andreia², SAMUEL Jane Lise^{2,3},

VODOVAR Nicolas^{2,3}, BERGMANN Andreas⁴, MEBAZAA Alexandre^{1,2,3}, AZIBANI Ferial²

Affiliations:

¹Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis - Lariboisière, AP-HP, Paris, France.

²UMR-S 942, INSERM, MASCOT, Paris University, Paris, France.

³University of Paris, Paris, France.

⁴4TEEN4 GmbH, Neuendorfstraße 15A, 16761, Hennigsdorf, Germany.

⁵ Emergency Department, University Hospital of Beaujon, APHP, Clichy, France

*Corresponding author: Prof Alexandre Mebazaa, M.D., Ph.D.,
alexandre.mebazaa@aphp.fr
Department of Anesthesia, Burn and Critical Care,
University Hospital Lariboisière
2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, FRANCE
Phone: [\(+33\) 01 49 95 80 85](tel:+33149958085)

Abstract

Introduction: sepsis, defined as a life threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, is a common and expensive worldwide disease. Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3), an ubiquitous enzyme involved in cleavage of small peptides, is elevated in the plasma of septic and septic shock patients. The greatest levels of circulating DPP3 (cDPP3) are found in non-survivors septic shock patients. The aim of this study was to evaluate the benefits of blocking cDPP3 by a specific antibody, Procizumab (PCZ), on cardiac function in an experimental model of sepsis-induced cardiac depression in rat. **Methods:** we blocked cDPP3 with PCZ in caecal ligature and puncture (CLP) model, in which animals showed myocardial depression and increased levels of cDPP3. Animals were monitored by invasive blood pressure and echocardiography. Results are presented as mean \pm SD, with $p < 0.05$ considered significant. **Results:** PCZ rapidly restored left ventricular shortening fraction (from $39 \pm 4\%$ to $51 \pm 2\%$ before and 30 min after PCZ administration ($p=0.004329$)). Cardiac output and stroke volume were higher in the CLP + PCZ group when compared to the CLP + PBS group (respectively 152 ± 33 mL vs 97 ± 25 mL for cardiac output ($p=0.0079$), and 0.513 ± 0.079 mL vs 0.301 ± 0.756 mL for stroke volume ($p=0.0079$)) with a markedly reduced plasma DPP3 activity 138 ± 70 U/L in CLP + PCZ group versus 735 ± 255 U/L ($p=0.048$) in the CLP + PBS group. Of note, PCZ rapidly reduced oxidative stress in the heart of the CLP + PCZ group when compared to those of the CLP + PBS group (respectively 13.3 ± 8.2 vs 6.2 ± 2.5 UI, $p=0.0047$, 120 min after administration). Survival rate was greater at 120 min in the CLP + PCZ when compared to the CLP + PBS (83% versus 63%, respectively, $p=0.0026$). **Discussion:** Our study demonstrates that inhibition of cDPP3 by PCZ restored altered cardiac function during sepsis in rats. We strongly suggest an important role for cDPP3 in sepsis-induced myocardial depression and PCZ as potential therapeutic option in sepsis.

Key words: septic shock, septic cardiomyopathy, Procizumab, angiotensin 2, myocardial depressant factor

Introduction

Sepsis is as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection with major impact worldwide (1). Septic shock, the deadliest form of sepsis, is characterized by low systemic blood pressure despite fluid resuscitation, organ dysfunction and high mortality, especially when accompanied by myocardial depression (2, 3). The precise mechanisms of organ dysfunction in sepsis still remain elusive, especially the induced-cardiac dysfunction (4, 5).

Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a ubiquitously expressed intracellular enzyme that is involved in the cleavage of small peptides (6). We recently showed that circulating DPP3 (cDPP3) was elevated in cardiogenic shock patients and that higher levels of cDPP3 were associated with altered hemodynamic and poor outcomes (7). Experimental studies showed that bolus administration of natively purified human DPP3 provoked a rapid and marked deterioration of heart contractile function in healthy mice (7). Furthermore, inhibition of cDPP3 by its specific antibody, Procizumab (PCZ), promptly restored cardiac contractility and decreased myocardial oxidative stress in a mouse model of acute cardiac stress, in which cDPP3 is increased (7).

In a preliminary study of a septic patient's cohort, patients with septic shock showed greater levels of cDPP3 compared to patients with severe sepsis (8). We hypothesised that cDPP3 levels could participate in the pathophysiology of cardiac dysfunction during septic shock. We, therefore, evaluated the effect of DPP3 inhibition by PCZ in a rat model of cardiac dysfunction induced by a septic shock.

Methods

☒ Sepsis model

Three-month-old male Wistar rats weighing 350-450 g (Janvier, St Berthevin, France) were used. All experiments were conducted in accordance with the National and European Institutes of Health Guidelines for the use of laboratory animals and were approved by the local research ethics committee (S140 #9385). Septic shock and hemodynamic monitoring were performed as previously described (9, 10). All animals were anaesthetized using an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (90 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg). Polymicrobial sepsis was provoked by cecal ligation and puncture (CLP) as previously described (10). Briefly, a ventral midline incision (1 cm) was made to allow exteriorization of the caecum. The caecum was then ligated just below the ileocecal valve and punctured once with an 18-gauge needle. The abdominal cavity was closed in two layers, and rats were given fluid resuscitation (3 mL/100 g of body weight) of saline, injected subcutaneously). A sham operation was performed by isolating the caecum with neither ligation nor puncture (sham group). Intraperitoneal injection of 75 µg/kg of buprenorphine was performed for analgesic purposes in the preoperative period. After general anaesthesia with ketamine hydrochloride (90 mg/kg) and xylazine (9mg/kg), animals were placed in the supine position and intubated with a 16 G catheter and ventilated using a rodent ventilator with the respiratory rate set at $53.5 \times \text{weight}^{-0.26}$ and the tidal volume set at $6.2 \times \text{weight}^{1.01}$ (9). Rectal temperature was maintained throughout the protocol at 37-37.5°C by a heating mat. Catheters were inserted into the left jugular vein to administer treatment or placebo and into the right carotid artery for invasive blood pressure monitoring.

Based on the SEPSIS-3 consensus definition of septic shock (1), we only included rats with mean blood pressure (MBP) below 65 mmHg. To ensure to have a cardiac dysfunction, we included only animals with a left ventricular shortening fraction (LVSF) below 45%. Sixteen hours post-surgery, septic rats were randomly assigned to receive PBS (PBS group) or PCZ (PCZ group). After a bolus injection of 1.5 mL PBS or PCZ (concentration of 1 mg/ml) through the jugular vein in 5 min, which is equivalent as a fluid resuscitation, PBS (2 mL) and PCZ were continuously infused with an electric syringe (2 mL at the concentration of 0.42 mg/mL) during the 120 minutes of follow-up. The experimental protocol is summarized in Fig. 1A.

☒ Hemodynamics and cardiac function monitoring

Monitoring of hemodynamics and cardiac function were performed as previously described (9, 11).

Echocardiography parameters were measured by transthoracic echocardiography (TTE) using Vivid 7 system (General Electrics, USA) equipped with a 14-MHz linear transducer for rats, before randomization (16 hours after CLP or sham procedure) and every 30 min during the 120 minutes of the protocol (Fig. 1A). All acquisitions were recorded digitally and stored for subsequent off-line analysis (12). Invasive blood pressure measurements, by using arterial catheter in carotid artery and recorded by Biopac® system and AcqKnowledge® 5.0 software (California, USA) for data acquisition, were performed before randomization and every 30 minutes after the beginning of therapy (PBS or PCZ injection) during the 120 minutes of the protocol.

☒ Anatomical examination and tissue preparation

At the end of the protocol, the rats were sacrificed by lethal anaesthesia with an injection of 40mg/kg of pentobarbital solution (CEVA, Libourne, France). The heart was transversally divided into two parts: the base part was embedded into Tissue-Tek optimal cutting temperature (OCT) compound (VWR Chemicals, Jeuen, Belgium) and frozen into liquid nitrogen precooled isopentane; the apex was snap-frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C for further analyses. Heparin blood was collected from the left carotid artery at the end of the experiment, centrifuged at 3500 rpm for 15 min at 4°C, and plasma was stored at -80°C.

☒ Plasma DPP3 activity

Plasma DPP3 activity was measured using the soluble activity assay (SAA) with a fluorogenic substrate (15). Briefly, 10 µl of rat heparin-plasma were incubated with 90 µl of a substrate reagent solution (50 mM Tris/HCl, pH 7.8 (25°C), 0.125% Triton X-100, 100 µM Arg2-β-naphthylamide (Arg2-βNA, Bachem AG) for 1 h at 37°C in black 96-well microtiter plates. Fluorescence of the cleaved product βNA was detected at 420 nm using the Twinkle LB 970 fluorometer (Berthold Technologies GmbH).

☒ Gene expression analyses

Total RNA were isolated from tissues using the RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed using QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Courtaboeuf, France). Subsequently, real-time quantitative polymerase chain reaction was performed on a LightCycler96 (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the FastStart Essential DNA Green Master® (Roche Diagnostics, Meylan, France). Transcripts levels for genes of interest were normalized to that of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and expressed as the relative change compared to the control samples. The sequences of the primers used are reported in Supplemental Table 1.

☒ Dihydroethidium staining

Dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich) was performed on 7 µm myocardial cross-cryosection as previously described (7, 9).

☒ Statistics

Data are expressed as mean ± SD. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. For two-group comparisons, Wilcoxon signed-rank test or Wilcoxon rank-sum test were used as appropriate. Comparison between more than two groups was performed by one-way ANOVA, Kruskal–Wallis test or repeated-measures ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test, as appropriate. A Kaplan–Meier curve and log-rank survival were performed with a 95% confidence interval to evaluate survival. A p-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using R software (R Core Team, 2014) and figures were produced using ggplot2 (Wickham 2009).

Results

PCZ decreased plasmatic DPP3 activity and myocardial DPP3 transcription

Sixteen hours after the CLP or sham procedure, clinical signs of sepsis (reduced motor activity, lethargy, shivering, piloerection and hunched posture) were only present in CLP and not sham rats. Furthermore, post-mortem examination of the abdominal cavity of all CLP rats showed varying degrees of peritonitis with a grey-black dilated caecum and purulent and malodorous peritoneal fluid. Overall, thirty-six rats were enrolled in the study: 11 in the CLP + PCZ group, 6 in the CLP + PBS group and 12 in the sham group (Fig. 1B). Baseline characteristics of the sham and CLP animals after randomisation are summarized in Table 1A.

Interestingly, we found that the CLP + PBS animals had a higher cDPP3 plasma activity than the sham animals at 120 min (735 ± 255 U/L vs 94 ± 41 U/L, $p=0.0063$ respectively) (Fig 2A). Similarly, *DPP3* transcripts were up-regulated in the heart of the CLP + PBS animals compared to the sham group (1.17 ± 0.40 AU in CLP + PBS compared to 0.52 ± 0.10 in the sham group, $p=8.2e-5$) (Fig. 2B). Plasma cDPP3 activity was lower at 120 min in the PCZ group when compared to the PBS group (138 ± 139 U/L vs 735 ± 722 U/L, $p=0.048$) (Fig 2A), without modifying the myocardial transcription of *DPP3* (1.59 ± 0.35 vs 1.17 ± 0.13 in CLP + PBS group, $p=0.27$) (Fig. 2B).

PCZ promptly restored cardiac systolic dysfunction in septic animals

PCZ administration rapidly restored LVSF from $39 \pm 4\%$ to $51 \pm 2\%$ within 30 min of PCZ initiation ($p=0.004329$). LVSF was higher in CLP + PCZ group when compared to CLP + PBS group ($p=0.00028$) (Fig. 2C). The LVSF of the PBS rats remained unchanged ($p=0.5557$; Fig 2C). At the end of the protocol – i.e. 120 minutes after the initiation of PCZ or PBS - administration of PCZ was associated with a greater CO (Fig 2D) and SV (Fig 2 E) compared to the animals receiving PBS. In contrast, heart rate (HR) and MBP measured at 120 minutes were similar in all the CLP groups (Fig. 2F and G). Finally, the survival rate was greater at 120 min in the PCZ group compared to the PBS group (83% versus 63%, $p=0.0026$, log-rank test) (Supplemental Fig. 1). Of note, LVSF and other hemodynamic parameters remained stable throughout the duration of the experiment in the sham group (Supplemental. Fig 2).

At the cardiac level, PCZ administration rapidly reduced oxidative stress in the heart of the PCZ group compared to those of the PBS group (respectively 13.3 ± 8.2 vs 6.2 ± 2.5 UI, $p=0.0047$, 120 min after PBS or PCZ injection, respectively; Supplemental Fig.3 A and B). However, PCZ group was not accompanied by any change in the myocardial *HO-1* and *NQO1* expression, two oxidative stress-induced genes, when compared to the non-treated septic group (respectively 7.90 ± 4.38 AU vs 5.42 ± 2.03 AU $p=0.33$ and 5.21 ± 2.33 AU vs 4.49 ± 1.91 , $p=0.61$) (Supplemental Fig 3 C and D).

Discussion

Our study demonstrates that inhibition of cDPP3 by PCZ restored cardiac contractility in septic rats. These data indicate that cDPP3 play an important part in sepsis-induced myocardial depression and suggest PCZ as a promising therapeutic option in this context.

Today, the pathophysiology of sepsis-induced myocardial depression is still not fully understood. Parrillo et al. have described for the first time a “myocardial depressant factor” (13). Since this hypothesis was drawn, several factors (included cytokines) were described to be associated with myocardial depression during sepsis or other acute conditions (14–19). Others authors hypothesized that the down-regulation or uncoupling of the adrenergic receptors induced by the sepsis can explain the absence of response to endogenous and exogenous catecholamines, leading to septic shock (20). Lastly, an increased oxidative stress level may be implicated in triggering myocardial dysfunction during sepsis (21–23). Finally, the alteration of angiotensin 2 pathway is another potential, but poorly studied, mechanism implicated in septic cardiomyopathy. The RAAS pathway is clearly modified by sepsis (20) with altered angiotensin 2 levels and a reduced angiotensin 2 sensitivity, via the reduction or the uncoupling of angiotensin 2 receptors and the deterioration of its positive inotropic effects (20, 24–27). Here, by using a sepsis-induced model in rat, we demonstrated that blocking cDPP3 with PCZ resulted in marked cardiac contractile benefits in septic shock. The present data reinforce cDPP3 as a potential myocardial depressing factor and suggest a similar role of DPP3 regardless of the aetiology of the cardiac dysfunction. Furthermore, the elevation of plasma cDPP3 could reduce angiotensin 2 levels by cleavage into angiotensin 4 (6, 28), as we previously observed in mouse and human plasma samples spiked with recombinant DPP3 (7). Thus, the restoration of the cardiac function in septic rats by blocking DPP3 could result from the potentiation of angiotensin 2 that would be normally inactivated. Altogether, these data strongly suggest that DPP3 could be the long-searched myocardial depressing factor, which would act by decreasing the angiotensin 2 signalling pathway when increased in septic shock.

Our study has some limitations. First, septic animals have not been fully resuscitated, especially we didn't treat animals with antibiotics. However, given the duration of the protocol, the administration of antibiotics is not expected to provide any improvement on the animal status. Along the same line, animals did not receive any

exogenous catecholamine as the aim was to evaluate the hemodynamic benefit of DPP3 blockade. Nevertheless, further studies are warranted to evaluate the benefit of PCZ in fully resuscitated animals, including probabilistic antibiotherapy and catecholamine administration. Second, we do not assess sex differences responses to PCZ treatment as only males mice were included in this preclinical studies. This is a common bias in experimental studies and more studies are needed to fill this gap.

We previously shown that cDPP3 is myocardial depressant factor in healthy and acute heart failure mice (7). Our study extends the role of cDPP3 in septic shock as a myocardial depressant factor. Additionally, inhibition of high levels of cDPP3 by PCZ in septic rats restored cardiac contraction and improved survival, suggesting PCZ as a possible therapeutic option inpatient with septic shock. The use of PCZ could possibly limit the use of high doses of inotropes during septic shock, which has been associated with deleterious effects (29, 30). Mechanisms of action of PCZ, probably via increasing of circulating endogenous angiotensin 2 levels, need to be explored in others preclinical studies included large animal models, as well as in humans.

References

1. M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, D. C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
2. S. J. Beesley, G. Weber, T. Sarge, S. Nikravan, C. K. Grissom, M. J. Lanspa, S. Shahul, S. M. Brown, Septic Cardiomyopathy, *Crit. Care Med.* **46**, 625–634 (2018).
3. M. C. Cimolai, S. Alvarez, C. Bode, H. Bugger, Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy, *Int J Mol Sci* **16**, 17763–17778 (2015).
4. J. E. Gotts, M. A. Matthay, Sepsis: pathophysiology and clinical management, *BMJ* **353**, i1585 (2016).
5. D. C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N. Engl. J. Med.* **369**, 2063 (2013).
6. S. C. Prajapati, R. Singh, S. S. Chauhan, Human dipeptidyl peptidase III regulates G-protein coupled receptor-dependent Ca²⁺ concentration in human embryonic kidney 293T cells, *Biol. Chem.* **397**, 563–569 (2016).
7. B. Deniau, L. Rehfeld, K. Santos, A. Dienelt, F. Azibani, M. Sadoune, P. R. Kounde, J. L. Samuel, H. Tolpannen, J. Lassus, V.-P. Harjola, N. Vodovar, A. Bergmann, O. Hartmann, A. Mebazaa, A. Blet, Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics, *Eur. J. Heart Fail.* (2019), doi:10.1002/ejhf.1601.
8. L. Rehfeld, E. Funk, S. Jha, P. Macheroux, O. Melander, A. Bergman, Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples, *J. Appl. Lab. Med.* (2018).
9. A. Blet, B. Deniau, C. Geven, M. Sadoune, A. Caillard, P.-R. Kounde, E. Polidano, P. Pickkers, J.-L. Samuel, A. Mebazaa, Adrecizumab, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats, *Intensive Care Med Exp* **7**, 25 (2019).
10. D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, P. A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat Protoc* **4**, 31–36 (2009).
11. P. Bonnin, J. Vilar, B. I. Levy, Effect of normovolemic hematocrit changes on blood pressure and flow, *Life Sci.* **157**, 62–66 (2016).
12. P. Milliez, S. Messaoudi, J. Nehme, C. Rodriguez, J.-L. Samuel, C. Delcayre, Beneficial effects of delayed ivabradine treatment on cardiac anatomical and electrical remodeling in rat severe chronic heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H435-441 (2009).
13. J. E. Parrillo, C. Burch, J. H. Shelhamer, M. M. Parker, C. Natanson, 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, *J. Clin. Invest.* **76**, 1539–1553 (1985).
14. N. Pathan, C. Sandiford, S. E. Harding, M. Levin, Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia, *Crit. Care Med.* **30**, 2191–2198 (2002).
15. N. Pathan, C. A. Hemingway, A. A. Alizadeh, A. C. Stephens, J. C. Boldrick, E. E. Oragui, C. McCabe, S. B. Welch, A. Whitney, P. O’Gara, S. Nadel, D. A. Relman, S. E. Harding, M. Levin, Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock, *Lancet* **363**, 203–209 (2004).
16. M. Odeh, Tumor necrosis factor-alpha as a myocardial depressant substance, *Int. J. Cardiol.* **42**, 231–238 (1993).

17. X. Meng, L. Ao, Y. Song, C. D. Raeburn, D. A. Fullerton, A. H. Harken, Signaling for myocardial depression in hemorrhagic shock: roles of Toll-like receptor 4 and p55 TNF-alpha receptor, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R600-606 (2005).
18. L. J. Greene, R. Shapanka, T. M. Glenn, A. M. Lefer, Isolation of myocardial depressant factor from plasma of dogs in hemorrhagic shock, *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 275–285 (1977).
19. H. Bitterman, G. L. Stahl, Z. Terashita, A. M. Lefer, Mechanisms of action of PGE1 in hemorrhagic shock in rats, *Ann Emerg Med* **17**, 457–462 (1988).
20. E. Antonucci, P. J. Gleeson, F. Annoni, S. Agosta, S. Orlando, F. S. Taccone, D. Velissaris, S. Scolletta, Angiotensin II in Refractory Septic Shock, *Shock* **47**, 560–566 (2017).
21. L. Martin, K. Horst, F. Chiazza, S. Oggero, M. Collino, K. Brandenburg, F. Hildebrand, G. Marx, C. Thiemermann, T. Schuerholz, The synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 attenuates septic cardiomyopathy and prevents down-regulation of SERCA2 in polymicrobial sepsis, *Sci Rep* **6**, 37277 (2016).
22. H. F. Galley, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis, *Br J Anaesth* **107**, 57–64 (2011).
23. M. S. Joshi, M. W. Julian, J. E. Huff, J. A. Bauer, Y. Xia, E. D. Crouser, Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 999–1007 (2006).
24. E. Feolde, P. Vigne, C. Frelin, Angiotensin AT1 receptors mediate a positive inotropic effect of angiotensin II in guinea pig atria, *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 63–66 (1993).
25. A. Meissner, J. Y. Min, R. Simon, Effects of angiotensin II on inotropy and intracellular Ca²⁺ handling in normal and hypertrophied rat myocardium, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2507–2518 (1998).
26. C. S. Moravec, M. D. Schluchter, L. Paranandi, B. Czerska, R. W. Stewart, E. Rosenkranz, M. Bond, Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro, *Circulation* **82**, 1973–1984 (1990).
27. M. G. Petroff, E. A. Aiello, J. Palomeque, M. A. Salas, A. Mattiazzi, Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium, *J. Physiol. (Lond.)* **529 Pt 1**, 189–203 (2000).
28. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D. P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida, H. Ogita, Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension, *Hypertension* **68**, 630–641 (2016).
29. D. T. Andreis, M. Singer, Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum, *Intensive Care Med* **42**, 1387–1397 (2016).
30. C. Martin, S. Medam, F. Antonini, J. Alingrin, M. Haddam, E. Hammad, B. Meyssignac, C. Vigne, L. Zieleskiewicz, M. Leone, NOREPINEPHRINE: NOT TOO MUCH, TOO LONG, *Shock* **44**, 305–309 (2015).

Legends

Table 1 legend. Hemodynamics and cardiac parameters in sham and CLP rats before randomisation (i.e. before PBS or PCZ injection). Values are expressed as mean \pm SD. Comparisons were performed by using Wilcoxon rank-sum test. (CO: cardiac output, DBP: diastolic blood pressure, HR: heart rate, LVSF: left ventricular shortening fraction, MBP: mean blood pressure, SBP: systolic blood pressure, SV: stroke volume).

Figures legends

Figure 1. Design and flow chart of the study. (A) Schematic representation of the preclinical experiment in rats, including treatments and hemodynamic assessment (BP: blood pressure, CLP: cecal ligation and puncture, PBS: phosphate buffered saline, PCZ: Procizumab, TTE: transthoracic echocardiography). (B) Flowchart of animals randomisation.

Figure 2. PCZ injection improved hemodynamics and cardiac function during sepsis. (A) Plasmatic DPP3 activity in sham, CLP + PBS and CLP + PCZ groups. Comparisons were made using Wilcoxon rank-sum test. (B) Myocardial qPCR of DPP3 of sham, CLP + PBS and CLP + PCZ rats. Comparisons were made by Wilcoxon rank-sum test. (C) Schematic representation of the evolution of the left ventricular shortening fraction in time in sham (blue dashed line), CLP + PBS (grey line) and CLP + PCZ groups (black line) ($p < 0.05$ using repeated measures of ANOVA). Red dashed line corresponds to the moment of bolus injection followed by infusion. (D) Evolution of the cardiac output, (E) stroke volume, (F) heart rate and (G) mean blood pressure before randomization and 120 min after therapy by PBS or PCZ injection in septic rats. Comparisons were performed by using Wilcoxon rank-sum test. (bpm: beats per minutes, CLP: cecal ligation and puncture).

Take home figure: cDPP3 is implicated in septic myocardial depression. Its inhibition by a specific antibody, Procizumab, could be a tool to restore impaired cardiac function.

Supplemental Fig. captions

Supplemental Fig. 1. Survival curve 120 min after PBS or PCZ injection. (CLP: cecal ligation and puncture, PBS: phosphate buffered saline, PCZ: Procizumab. Log rank test was used.

Supplemental Fig. 2. Hemodynamics and cardiac parameters remain stable in sham animals. Schematic representation of the evolution of the left ventricular shortening fraction (A), mean blood pressure (B), cardiac output (C), stroke volume (D) and heart rate (E) 16 hours after sham surgical procedure. Comparisons were made by using repeated measures of ANOVA.

Supplemental Fig. 3. PCZ injection improved myocardial oxidative stress. Representative images (A) and quantification (B) of DHE staining from myocardial sections of sham, CLP + PBS and CLP + PCZ animal groups. Myocardial mRNA expression of *HO-1* and *NQO-1* in sham, CLP + PBS and CLP + PCZ groups. Comparisons were made by Wilcoxon rank-sum test. (DHE: dihydroethidium, *HO-1*: heme oxygenase 1, *NQO-1*: NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)).

Supplemental table 1 legend. Primers used for qPCR.

Competing interests: AM reports personal fees from Novartis, personal fees from Orion, personal fees from Roche, personal fees from Servier, grants and personal fees from Adrenomed, grants and personal fees from Abbott, personal fees from Sanofi, personal fees from Otsuka, personal fees from Philips, grants from 4TEEN4 and AM owns less than 3,000 euros shares of S-Form Pharma company. BD and ABI were invited in meeting in Henningsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. KS is employed at 4TEEN4 Pharmaceuticals. AB is CEO and shareholder at 4TEEN4 Pharmaceuticals. 4TEEN4 owns intellectual properties related to therapeutic use of DPP3 inhibitors and diagnostic use of DPP3. Others author declared no potential conflicts of interest with respect to the research authorship and/or publication of this article.

Figures



Figure 1

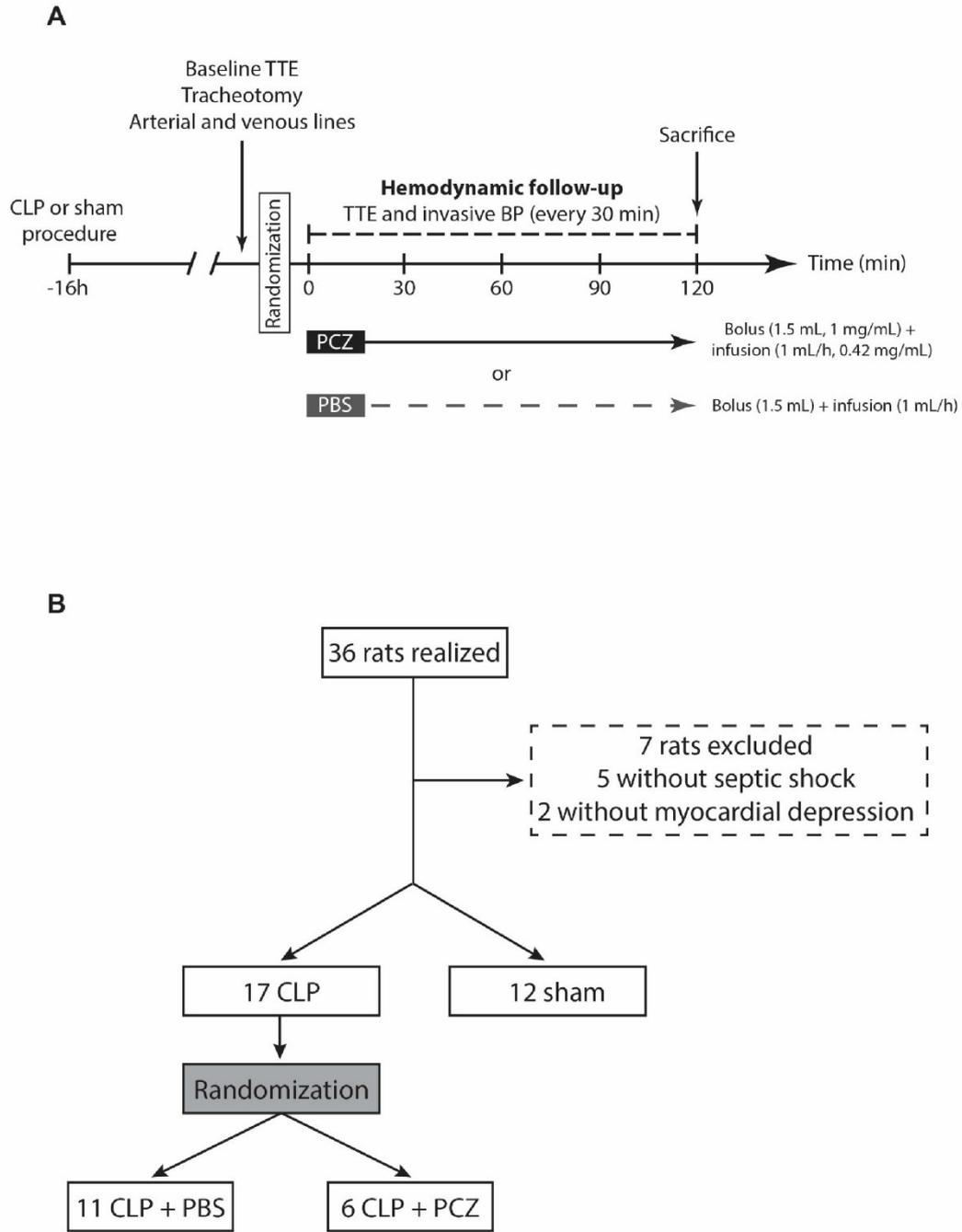
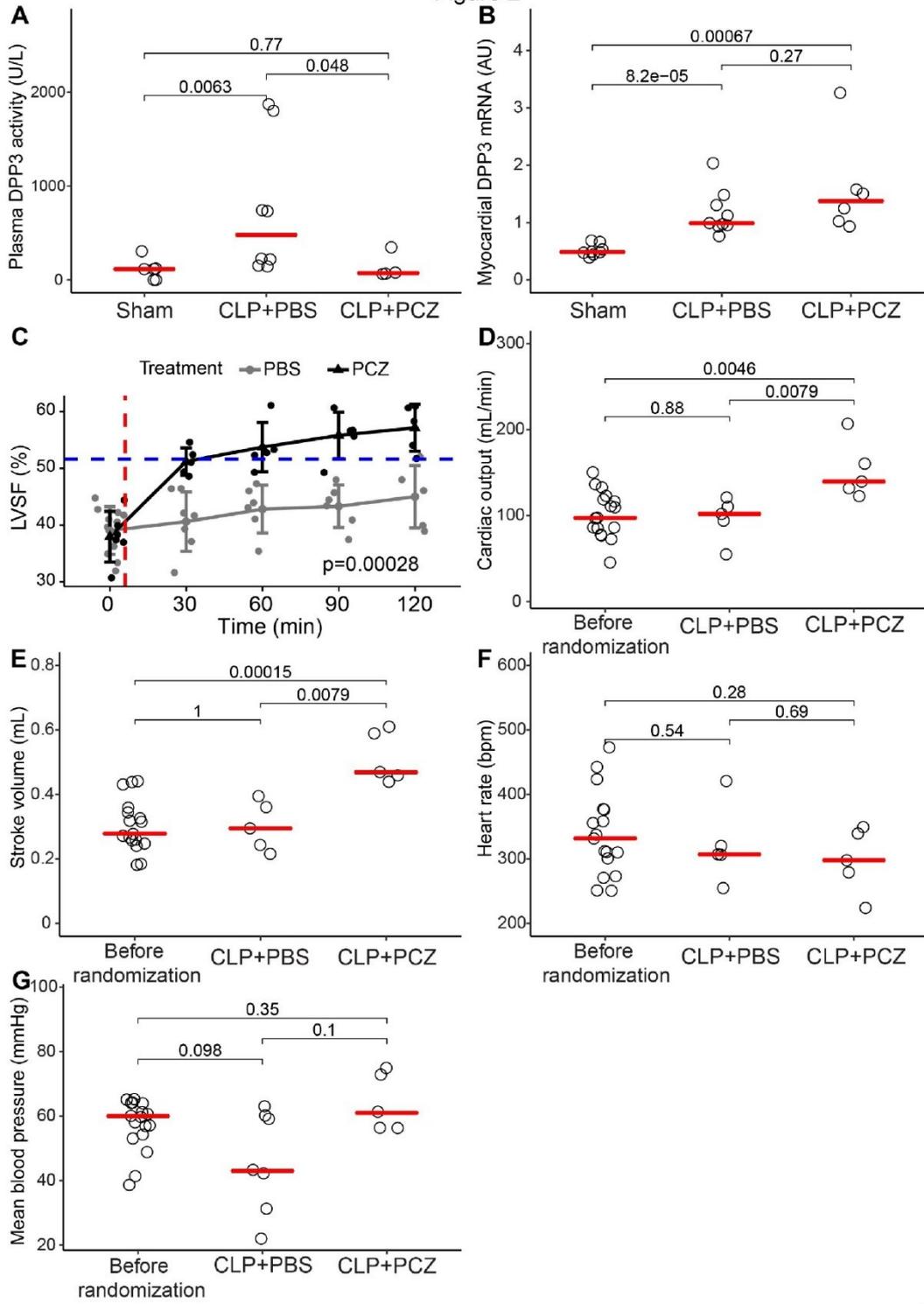
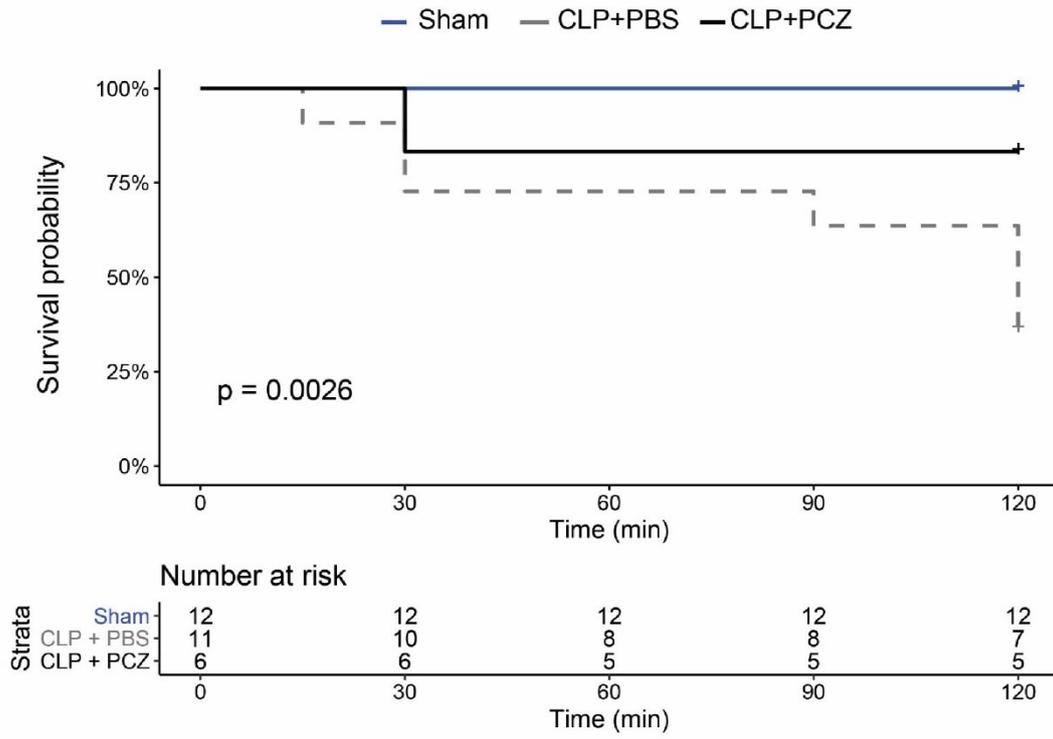


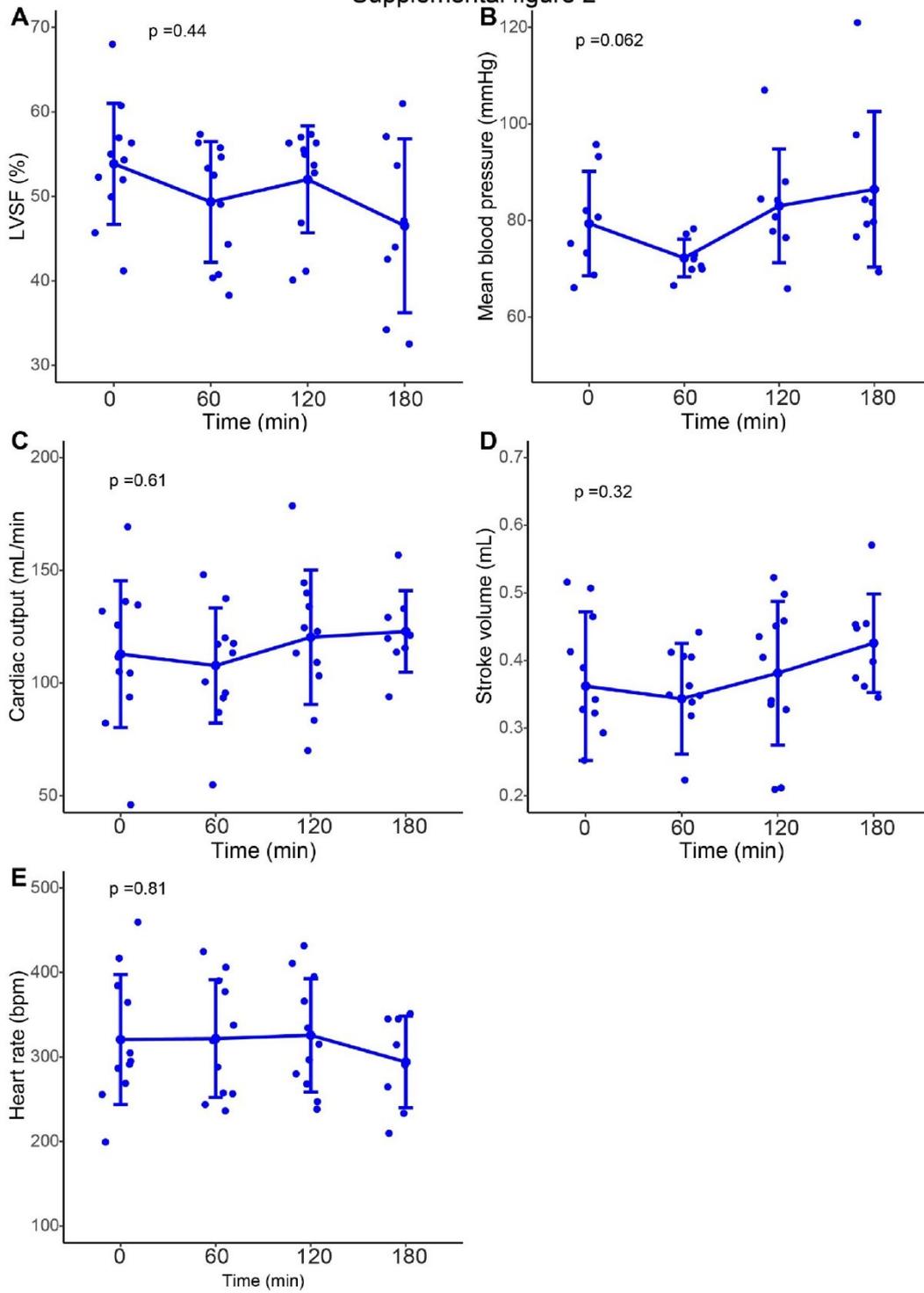
Figure 2



Supplemental figure 1

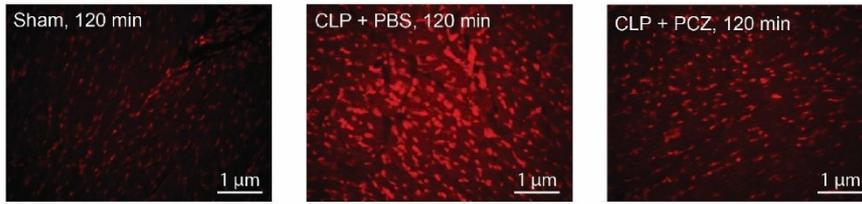


Supplemental figure 2

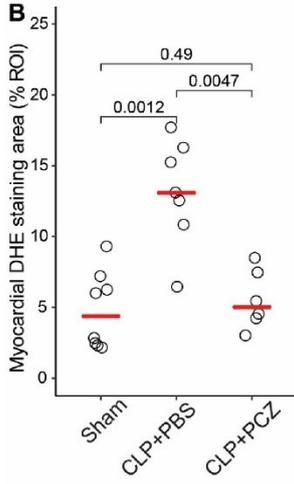


Supplemental figure 3

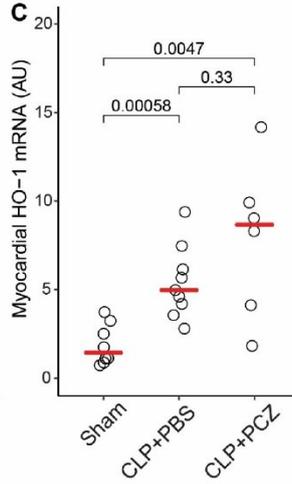
A



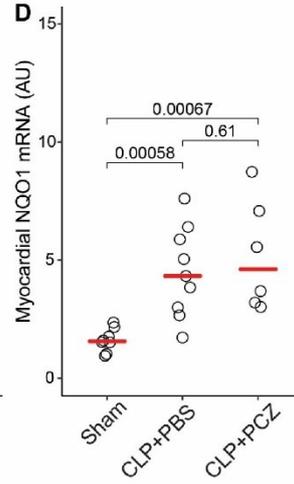
B



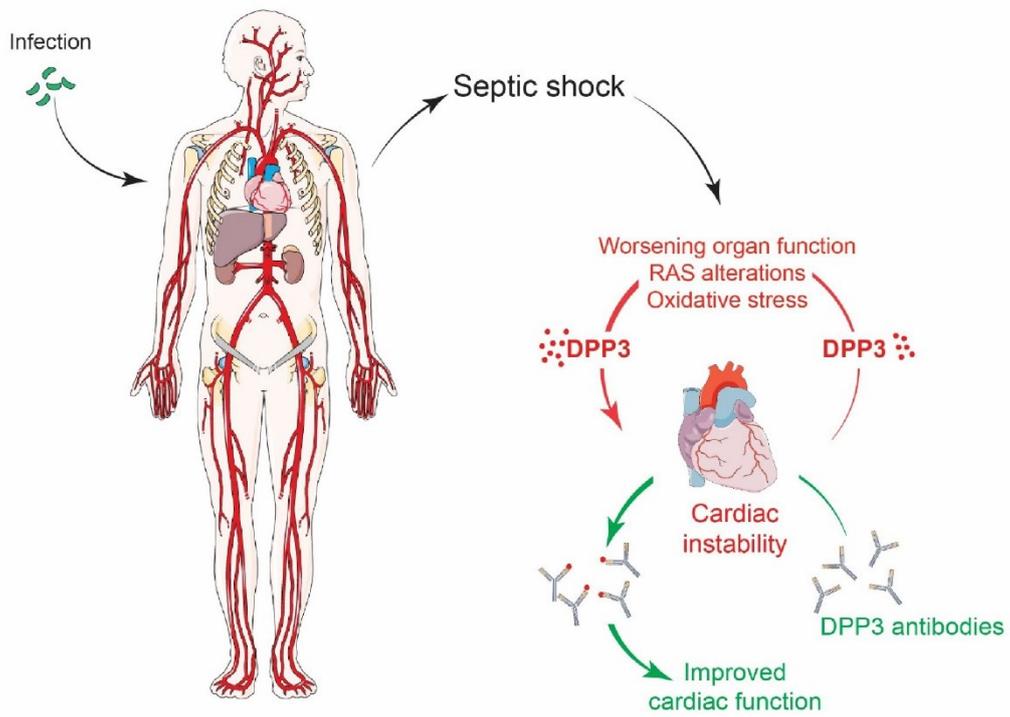
C



D



Take home figure



Tables

A

| | Sham | CLP before randomization | p |
|------------------|-----------------|--------------------------|--------|
| | n=12 | n=17 | |
| LVSF (mean ± SD) | 54 ± 7 % | 39 ± 4 % | <0.001 |
| SBP (mean ± SD) | 99 ± 11 mmHg | 79 ± 10 mmHg | <0.001 |
| DBP (mean ± SD) | 70 ± 12 mmHg | 46 ± 10 mmHg | <0.001 |
| MBP (mean ± SD) | 79 ± 11 mmHg | 57 ± 8 mmHg | <0.001 |
| HR (mean ± SD) | 321 ± 77 bpm | 341 ± 62 bpm | 0.428 |
| CO (mean ± SD) | 113 ± 33 mL/min | 99 ± 26 mL/min | 0.231 |
| SV (mean ± SD) | 0.36 ± 0.11 mL | 0.30 ± 0.08 mL | 0.064 |

B

| Name | Gene | Access GenBank | Forward sequence | Reverse sequence |
|-------|-------|----------------|------------------------|-----------------------|
| GAPDH | Gapd | NM_017008.4 | GTTCAACGGCACAGTCAAGG | ACTCCACGACATACTCAGCAC |
| DPP3 | Dpp3 | NM_053748.1 | GGAACCAAGGCTTCGACATC | TGAAGAGCCGGGTGTTGTAT |
| HO1 | Hmox1 | NM_012580.2 | TGCTGACAGAGGAACACAAAGA | CGGTCGCCAACAGGAAACT |
| NQO1 | Nqo1 | NM_017000.3 | ACCTTGCTTCCATCACCACC | GACGCTTCTTCCACCCTTCC |

3. Discussion

Notre étude démontre que l'inhibition de la DPP3 circulante par le Procizumab permet d'améliorer la dysfonction cardiaque d'origine septique chez le rat. Etant donné ces résultats, nous suggérons que la DPP3 est un FDM clé au cours de la dysfonction cardiaque d'origine septique.

En utilisant un modèle de sepsis chez le rat, nous avons pu démontrer que le blocage de la DPP3 par le Procizumab permettait d'améliorer la dysfonction cardiaque d'origine septique. Ainsi, le Procizumab, un anticorps spécifique de la DPP3, pourrait être une potentielle option thérapeutique en vue d'améliorer l'hémodynamique, les dysfonctions d'organes et la survie des patients atteints de choc septique, chez qui les taux de DPP3 seraient élevés. Nous avons récemment démontré que la DPP3 circulante est un facteur dépresseur myocardique au cours de l'insuffisance cardiaque aiguë grâce à :

- L'association délétère de hauts niveaux de DPP3, liés à une nécrose cardiomyocytaire importante, et la survie des patients en choc cardiogénique (302).
- La dépression myocardique induite par une injection unique de DPP3 chez l'animal sain (302).
- La restauration d'une fonction systolique normale suite au blocage de la DPP3 par le Procizumab dans un modèle d'IC aiguë à l'isoprénaline chez la souris (302).

La physiopathologie de la cardiomyopathie d'origine septique est complexe, et aujourd'hui non entièrement expliquée. Le phénomène de « décatécholaminisation » observé au cours du sepsis et défini comme un découplage et une inhibition des récepteurs adrénergiques (315) semble impliqué dans la physiopathologie de la dépression myocardique septique. D'autres mécanismes, notamment une altération du SRAA, peuvent participer à cette dysfonction. En effet, au cours du sepsis, une modification des taux circulants d'angiotensine 2 et une réduction de la sensibilité de ses récepteurs (type I et II) ont clairement été démontrés (315–319). Ceci a pour conséquence une altération de la réponse inotrope positive de l'angiotensine 2. Combiné au fait que la DPP3 clive l'angiotensine 2 en angiotensine 4 (et va donc réduire les taux circulants d'angiotensine 2), nous avons émis l'hypothèse

que de hauts niveaux de DPP3, secondaires au sepsis, pourraient être responsables d'une réduction de la concentration d'angiotensine 2 circulante. Ainsi, les défaillances cardiaques et endothéliales observées au cours du sepsis pourraient être en partie expliquées par de hauts taux de DPP3 libérés au cours du sepsis. Ainsi, chez les patients atteints de sepsis avec des niveaux élevés de DPP3, le Procizumab pourrait permettre de restaurer les taux endogènes d'angiotensine 2 et donc améliorer les dysfonctions vasculaire et cardiaque d'origine septique. L'utilisation du Procizumab pourrait permettre de réduire les doses de catécholamines utilisées au cours du choc septique dont les effets indésirables sont clairement démontrés aujourd'hui (320, 321).

Notre travail présente plusieurs limites. Premièrement, les animaux en choc septique n'ont pas été traités avec une antibiothérapie probabiliste adaptée après l'induction de la péritonite comme préconisé par les recommandations actuelles chez l'Homme. L'objectif de notre travail était d'évaluer les effets cardiovasculaires et hémodynamiques du Procizumab chez l'animal septique. Les études futures devront intégrer une réanimation optimale, incluant un remplissage vasculaire et une antibiothérapie probabiliste adaptés. Deuxièmement, seuls 6 animaux ont été inclus dans le groupe CLP + PCZ. La technique de ligature et ponction caecale est une procédure sévère, avec un taux élevé de mortalité (40% approximativement). Nous avons sélectionné uniquement les rats en choc septique présentant une défaillance cardiaque (soit 40% des survivants 16 heures après l'induction du sepsis). Dans le respect de la règle éthique des 3R, et étant donné l'effet cardiaque spectaculaire du Procizumab, nous avons décidé d'arrêter le recrutement à 6 animaux dans ce groupe. Nos résultats doivent être confirmés par des études incluant un nombre plus important d'animaux. Troisièmement, dans de nombreuses études expérimentales, seuls des rats mâles ont été inclus. Les études futures devront inclure des femelles.

Discussion générale

Discussion générale sur le rôle de DPP3 dans la défaillance cardiaque

La physiopathologie de la dépression myocardique au cours de l'IC aiguë est à ce jour non complètement élucidée. Les FDM, décrits il y a plus de 20 ans, sont un des principaux mécanismes de la dépression myocardique de l'IC aiguë. Les avancées techniques récentes permettent d'explorer de nouvelles voies métaboliques qui ne l'étaient pas auparavant. Ainsi, l'étude du SRAA au cours de l'IC aiguë permet de proposer des pistes de réflexion sur la physiopathologie de la dépression myocardique. De plus, l'identification de nouveaux acteurs impliqués dans la dépression myocardique permettra de proposer de nouveaux traitements en ciblant des molécules d'intérêt en particulier pour une pathologie dont aucun traitement efficace n'existe à ce jour.

Choix des modèles animaux

- *Modèle de défaillance cardiaque par injection d'isoprotérénol chez la souris*

Des doses excessives de catécholamines à tropisme cardiaque peuvent induire une destruction myocardique étendue et une nécrose cardiomyocytaire (322). L'isoproterenol est un agent synthétique sympathomimétique β -adrénergique (β_1 , 2, 3) responsable de la génération de radicaux libres qui vont induire du stress oxydant aboutissant à des dommages mitochondriaux, ainsi qu'une consommation excessive d'ATP (323). Un déséquilibre entre demande et besoin va alors être responsable d'une hypoxie tissulaire altérant le métabolisme cellulaire cardiaque menant à une nécrose diffuse (311) puis à la fibrose myocardique (324). Il s'agit d'un modèle de cardiopathie aiguë (323–326) simple et reproductible. D'autres modèles de défaillance cardiaque existent (notamment l'ischémie par ligature coronaire). Le modèle de défaillance cardiaque par injection d'isoprotérénol est un modèle largement utilisé et maîtrisé dans notre unité de Recherche. Cependant, les résultats obtenus, notamment l'amélioration de la fonction systolique après l'injection de Procizumab dans le modèle à l'ISO, doivent être validés dans d'autres modèles.

- *Modèle de cardiomyopathie septique par ligature ponction caecale (LPC) chez le rat*

Le sepsis est une pathologie fréquente avec un haut taux de morbidité et de mortalité (60). Sa physiopathologie est complexe et non entièrement élucidée (327). Les modèles animaux jouent un rôle central dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis bien que tous ne valent pas en terme de pertinence clinique et ne soient pas extrapolables au sepsis humain (328). Trois principaux modèles expérimentaux de sepsis existent actuellement :

- Administration d'exotoxines (zymosan (329) ou lipopolysaccharides (LPS) (330–333))
- Administration directe d'agents pathogènes (334–337)
- Péritonite stercorale par LPC (338)

Le choix du modèle de sepsis était basé sur la pertinence de la physiopathologie la plus proche de celle du sepsis humain. La péritonite stercorale par la réalisation d'une LPC est le modèle de sepsis de choix répondant à ses critères (339, 340). Il s'agit d'un modèle simple, reproductible et rapidement responsable d'un choc septique avec défaillance d'organes, dont la sévérité peut être modulée par la largeur de la perforation et la force de la ligature (338, 340). Cependant, il est impossible de contrôler l'inoculum bactérien, contrairement à d'autres modèles (340). Par ailleurs, le contenu gastro intestinal des animaux, principalement herbivores, varient entre les espèces limitant la reproductibilité des résultats à d'autres espèces (340). Au final, la LPC est considérée comme la méthode de référence pour l'induction d'un sepsis chez le murin, dans le but de mimer la physiopathologie du sepsis humain et d'utiliser uniquement des animaux mâles jeunes sans comorbidités. Comme tout modèle expérimental, la LPC a des limites, notamment celles de ne pas recréer à l'identique le sepsis humain. De plus, les animaux ne bénéficiaient pas de toutes les manœuvres de réanimation (pas de remplissage vasculaire ni d'antibiotiques).

Implication de la DPP3 dans la défaillance cardiaque d'origine catécholaminergique

Ce travail a mis en évidence que la DPP3, une enzyme cytosolique libérée en cas de souffrance cellulaire, est un FDM, dont le taux plasmatique à l'admission des patients atteints de choc cardiogénique est associé à la mortalité. De plus, l'injection de DPP3 a un effet cardio-dépresseur chez l'animal sain. Cette altération de la fonction cardiaque est associée à une diminution des taux l'ensemble des angiotensines. L'inhibition de la DPP3 par un anticorps spécifique, le Procizumab, dans un modèle de choc cardiogénique chez la souris permet de rapidement normaliser la fonction cardiaque des animaux atteints d'IC.

Le modèle d'IC aiguë à l'isoprotérénol a été choisi dans notre travail car il mime les conséquences cardiaques et systémiques observées au cours de l'IC aiguë, dont l'étiologie principale est ischémique. De plus, ce modèle s'accompagne d'une nécrose cellulaire cardiaque diffuse comme observée au cours du choc cardiogénique (55, 310–312).

En inhibant spécifiquement la DPP3 avec une haute spécificité grâce au Procizumab, nous identifions clairement le rôle clé de DPP3 dans l'altération de l'hémodynamique générale au cours de l'IC aiguë. Cette inhibition permettait d'améliorer très rapidement (en moins d'une heure), la fonction cardiaque et l'hémodynamique rénale altérées suite à des injections répétées d'isoproterenol.

Dans l'étude CardShock, nous avons montré l'existence d'une association négative entre les taux élevés de DPP3, libérés suite à une nécrose cellulaire myocardique diffuse, chez les patients admis en réanimation pour un état de choc cardiogénique et la mortalité dans les 90 jours suivants. Plus le taux initial de DPP3 était élevé, plus la mortalité était augmentée chez ces patients. Ceci était confirmé par des besoins moindres en catécholamines et un meilleur pronostic rénal chez les patients ayant les taux les plus bas de DPP3. Nos résultats concordent avec ceux de l'étude OptimaCC (297) qui a montré que

les patients en état de choc cardiogénique après infarctus du myocarde avec des taux élevés de DPP3 avaient un index cardiaque plus bas, un risque plus important de développer un état de choc réfractaire et de développer une défaillance rénale que les patients qui présentaient un taux bas de DPP3. Les résultats de notre étude combinés à ceux de l'étude OptimaCC suggère la nécessité d'évaluer les effets bénéfiques du Procizumab pour rétablir l'hémodynamique systémique et améliorer le pronostic des patients en IC aiguë.

Notre travail identifie le rôle central de la DPP3 dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque. Les mécanismes précis par lesquels la DPP3 induit cette dépression myocardique sont actuellement inconnus et nécessite des travaux complémentaires. Il semblerait que ces mécanismes sont très rapides. L'hypothèse d'un métabolisme rapide de peptides cardiovasculaires agissant sur la fonction contractile du cœur est la principale retenue aujourd'hui. Cette hypothèse repose sur la chute des taux d'angiotensines dans le plasma humain en présence de doses progressivement croissantes de DPP3. Des études supplémentaires sont nécessaires, et devront notamment s'intéresser aux enképhalines circulantes, substrats de la DPP3 ayant des propriétés inotropes positives.

DPP3 et défaillance rénale.

L'injection de DPP3 chez la souris saine induisait une dépression myocardique objectivée par une diminution de la fraction de raccourcissement, ainsi qu'une augmentation transitoire des index de résistance rénaux calculés par enregistrement doppler de l'artère rénale droite. A ce jour, aucune donnée de la littérature n'existe quant au rôle de la DPP3 au niveau rénal. Il s'agit du premier travail s'intéressant aux effets hémodynamiques rénaux de la DPP3 chez la souris. Une réduction des flux liée à une défaillance cardiaque peut expliquer les effets observés lors de l'injection de la DPP3 chez la souris saine. De plus, dans le modèle à l'isoprotérénol qui s'accompagnait d'une augmentation des index de résistance rénaux, l'injection de PCZ permettait de les normaliser rapidement dans les 6h. Un effet direct de la DPP3 au niveau endothélial mais aussi du PCZ ne sont pas à exclure. Des études complémentaires,

avec notamment l'utilisation de modèles expérimentaux de défaillance rénale (avec investigations hémodynamiques, utilisation de marqueurs d'insuffisance rénale plasmatiques et urinaires, etc...), sont nécessaires pour répondre à ces questions.

Notre travail présentait plusieurs limites. Premièrement, nous avons étudié l'effet du blocage de la DPP3 par le Procizumab dans un seul modèle d'IC aiguë. En effet, notre travail est une preuve de concept reposant sur le fait que la DPP3 est un FDM, potentielle cible thérapeutique de l'IC. Nos résultats doivent être confirmés par des études précliniques (et donc dans d'autres modèles de défaillance cardiaque) et cliniques de plus grande échelle. Deuxièmement, le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est relativement faible. Comme décrit dans la section résultats de notre travail, les données individuelles, aussi bien à la suite de l'injection de la DPP3 que de l'injection de Procizumab, vont toutes dans le même sens. La même injection (DPP3 ou Procizumab) produisait le même effet chez tous les animaux. De plus, selon la règle des 3R, le nombre d'animaux a été limité à son strict minimum. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer nos résultats. Troisièmement, les mécanismes physiopathologiques exacts de l'induction de la dépression myocardique par DPP3 et de l'amélioration quasi instantanée de la fonction cardiaque après l'injection de Procizumab ne sont pas clairement élucidés pour le moment. Des études complémentaires, avec un nombre d'animaux plus conséquent, et d'autres conditions (en absence ou en présence de Procizumab, en absence ou en présence d'inhibiteur de l'enzyme de conversion et antagonistes de récepteur de l'angiotensine 2) sont nécessaires pour répondre à ces questions.

En conclusion, notre travail suggère qu'un taux de DPP3 élevé dans le plasma pourrait être un potentiel FDM associé à une mortalité plus élevée et une dysfonction d'organe plus importante chez les patients en état de choc cardiogénique ainsi que dans un modèle de défaillance cardiaque aiguë chez la souris. Des études complémentaires sont nécessaires pour comparer les propriétés pronostiques de DPP3 à celles des autres biomarqueurs actuellement utilisés dans l'IC aiguë (troponine et peptides natriurétiques

principalement). De plus, notre travail démontre que l'inhibition de la DPP3 circulante par le Procizumab permet de normaliser très rapidement et durablement la fonction cardiaque chez des souris rendues insuffisantes cardiaques suite à des injections répétées d'isoproterenol. Les mécanismes d'action du Procizumab et la confirmation de ces effets bénéfiques sur l'hémodynamique dans des études précliniques et cliniques de plus grande échelles sont nécessaires pour proposer cet anticorps comme un nouveau traitement de l'IC aiguë.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Premièrement, nous allons poursuivre les investigations expérimentales notamment sur le plan biologique dans le but de comprendre très précisément l'implication de DPP3 dans la dépression myocardique au cours du choc cardiogénique, ainsi que les mécanismes et voies cellulaires impliquées. De plus, nous allons étudier le rôle de DPP3 dans d'autres cardiopathies, notamment septique, comme présenté dans le travail suivant. Grâce aux effets bénéfiques du Procizumab, notamment sur la dépression myocardique du choc cardiogénique chez l'animal, nous projetons d'utiliser l'anticorps pour diminuer le taux de DPP3 circulant anormalement élevé dans d'autres modèles de défaillances cardiaques. Des études chez l'Homme, notamment de tolérance et de sécurité puis d'efficacité, sont déjà prévues dans le but de proposer le Procizumab comme option thérapeutique du choc cardiogénique et de la prévention de la défaillance d'organes lorsque nos résultats seront confirmés.

Implication de la DPP3 dans la dépression myocardique d'origine septique.

Nous avons pu démontrer dans ce travail que le taux DPP3 à l'admission en réanimation était un marqueur pronostique de survie et de survenue de défaillance d'organes chez les patients hospitalisés pour sepsis. De plus, nous avons pu démontrer dans un modèle de choc septique chez le rat que

l'inhibition de DPP3 par le Procizumab restaurait la défaillance cardiaque d'origine septique. Ainsi, nous démontrons que le DPP3 occupe une place centrale dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque d'origine septique et que le Procizumab est une option thérapeutique intéressante.

Dans un travail en cours de publication, des données issues d'une population de patients atteints de sepsis et admis en réanimation ont été analysé (AdrenOSS Study). Nous démontrons que des taux élevés de DPP3 (valeur seuil à 45,1 ng/mL) étaient associés à un plus mauvais pronostic et à une augmentation de l'incidence de défaillances d'organes chez les patients septiques hospitalisés en réanimation. Nous avons montré que le DPP3 avait une valeur pronostique modérée à l'admission en réanimation en calculant l'aire sous la courbe mais présentait une meilleure capacité pronostic lorsque nous utilisions le modèle de Cox ajusté. La valeur pronostic de DPP3 à l'admission était meilleure lorsqu'elle était ajoutée aux valeurs des scores pronostics utilisés couramment en réanimation. Nous avons pu aussi démontrer qu'il existait une association entre des taux bas de DPP3 (<45 ng/mL) à J2 et une mortalité réduite à J90, même chez les patients qui avaient initialement un taux élevé de DPP3 à l'admission en réanimation. De même, le risque de développer une dysfonction d'organe à J7 était moindre chez les patients qui avaient un taux bas de DPP3 à J2

Concernant les dysfonctions d'organes, nous avons montré une association positive entre le taux circulant de DPP3 et le score SOFA à l'admission en réanimation qui restait vraie au cours de la phase de récupération chez les patients de la cohorte AdrenOSS-1. Les patients septiques avec des taux élevés de DPP3 à l'admission en réanimation mais qui diminuaient à J2 avaient moins de dysfonctions d'organes (notamment cardiovasculaire, rénale, pulmonaire et hépatique) que ceux dont les taux restaient élevés.

Dans le modèle de défaillance cardiaque d'origine septique chez le rat que nous avons utilisé pour ce travail, nous avons observé le bénéfice cardiaque du blocage spécifique de DPP3 par le Procizumab.

Ainsi, le Procizumab pourrait être une option thérapeutique intéressante dans l'amélioration de l'hémodynamique générale, des dysfonctions d'organes et de la survie chez les patients en choc septiques présentant des taux élevés de DPP3. Actuellement, aucun traitement spécifique de la cardiomyopathie septique n'est disponible, et son taux de mortalité reste élevé (341).

Nous avons démontré dans un travail précédent que le DPP3 circulant est un facteur dépresseur myocardique présent au cours de l'insuffisance cardiaque aiguë (302) en nous appuyant sur :

1. L'association délétère de niveaux élevés de DPP3, secondaire à la nécrose cellulaire myocardique (et d'autres organes) et la survie des patients en choc cardiogénique
2. La dysfonction cardiaque induite par une injection de DPP3 chez la souris saine
3. L'amélioration rapide de la dysfonction cardiaque suite à l'injection de Procizumab dans un modèle de défaillance cardiaque à l'isoproterenol chez la souris.

La physiopathologie de la cardiomyopathie d'origine septique est complexe, et aujourd'hui non entièrement expliquée. Le phénomène de « décatécholaminisation », présent au cours du sepsis et défini comme un découplage et une inhibition des récepteurs adrénergiques (315) semble impliqué dans la physiopathologie de la dépression myocardique septique. D'autres mécanismes, notamment une altération du système rénine angiotensine aldostérone, peuvent participer à cette dysfonction. En effet, au cours du sepsis, une modification des taux circulants d'angiotensine 2 et une réduction de la sensibilité de ses récepteurs (type I et II) ont clairement été démontrés (315–319). Ceci a pour conséquence une altération de la réponse inotrope positive de l'angiotensine 2. Combiné au fait que la DPP3 clive l'angiotensine 2 en angiotensine 4 (et va donc réduire les taux circulants d'angiotensine 2), nous avons émis l'hypothèse que de hauts niveaux de DPP3, secondaires au sepsis, pourraient être responsables d'une réduction de la concentration d'angiotensine 2 circulante. Ainsi, les défaillances cardiaques et endothéliales observées au cours du sepsis pourraient être en partie expliquées par de hauts taux de DPP3 libérés au cours du sepsis. Ainsi, chez les patients atteints de sepsis avec des niveaux

élevés de DPP3, le Procizumab pourrait permettre de restaurer les taux endogènes d'angiotensine 2 et donc améliorer les dysfonctions vasculaire et cardiaque d'origine septique. L'utilisation du Procizumab pourrait permettre de réduire les doses de catécholamines utilisées au cours du choc septique dont les effets indésirables sont clairement démontrés aujourd'hui (320, 321).

Notre travail présente plusieurs limites. Premièrement, les animaux en choc septique n'ont pas été traités avec une antibiothérapie probabiliste adaptée après l'induction de la péritonite. L'objectif de notre travail était d'évaluer les effets cardiovasculaires et hémodynamiques du Procizumab chez l'animal septique. Les études futures devront intégrer une réanimation optimale, incluant un remplissage vasculaire et une antibiothérapie probabiliste adaptés. Deuxièmement, seuls 5 animaux ont été inclus dans le groupe CLP + PCZ. La technique de ligature et ponction caecale est une procédure sévère, avec un taux élevé de mortalité (40% approximativement). Nous avons sélectionné uniquement les rats en choc septique présentant une défaillance cardiaque (soit 40% des survivants 16 heures après l'induction du sepsis). Dans le respect de la règle éthique des 3R, et étant donné l'effet cardiaque spectaculaire du Procizumab, nous avons décidé d'arrêter le recrutement à 5 animaux dans ce groupe. Nos résultats doivent être confirmés par des études incluant un nombre plus important d'animaux. Troisièmement, comme dans de nombreuses études expérimentales, seuls des rats mâles jeunes et non comorbides ont été inclus. Les études futures devront inclure des femelles.

Comme pour le premier travail présenté précédemment, les perspectives sont nombreuses (chez l'Homme et chez l'animal). Cependant, une meilleure compréhension du degré d'implication de la DPP3 dans la dépression myocardique de l'insuffisance cardiaque aiguë (catécholaminergique et septique) ainsi que les voies métaboliques impliquées sont essentielles.

En conclusion, nous avons démontré que le DPP3, un facteur dépresseur myocardique initialement décrit au cours du choc cardiogénique, est impliqué dans la dysfonction cardiaque d'origine septique.

L'inhibition de taux circulants élevés de DPP3 par le Procizumab permettait d'augmenter la contraction myocardique et d'améliorer la survie des animaux, faisant de cet anticorps une option thérapeutique intéressante dans le choc septique chez les patients les plus graves. Les mécanismes d'action du Procizumab et ses effets bénéfiques, probablement via une augmentation du taux endogène d'angiotensine 2 circulante, doivent être confirmés dans des études expérimentales et cliniques.

Perspectives générales

Perspectives générales

Les perspectives à venir pour ce projet sont nombreuses. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action de la DPP3 et du Procizumab, des investigations complémentaires chez l'animal sont en cours :

- développement d'un modèle de souris *knock-out* pour la DPP3
- la confirmation de nos résultats par des investigations hémodynamiques et cardiaques supplémentaires dans des modèles expérimentaux porcins (dont la physiologie se rapproche de celle de l'Homme).

En parallèle, des études d'efficacité et de toxicité du Procizumab sont actuellement en cours chez l'animal, en partenariat avec l'unité Inserm U942. Enfin, des études de phase I internationales, dans le but d'étudier la sécurité de l'utilisation du Procizumab chez les volontaires sains, sont programmées dans un futur très proche.

Conclusion générale

Conclusion générale

Grâce à ces travaux, nous démontrons que le DPP3 est un FDM impliqué dans le choc cardiogénique et dans la cardiomyopathie septique. Au cours de ces deux pathologies, suite à une nécrose cellulaire massive, les taux de DPP3 sont augmentés chez l'Homme. L'inhibition des taux excessifs de DPP3 circulant par le Procizumab, un anticorps spécifique de la DPP3, dans un modèle de défaillance cardiaque à l'ISO et dans un modèle de cardiomyopathie septique, permettait d'améliorer la contraction myocardique, l'hémodynamique rénale et d'améliorer la survie des animaux. Cet anticorps se positionne comme une option thérapeutique intéressante dans les états de chocs cardiogéniques et septiques les plus graves. Cependant, les mécanismes d'action du Procizumab ne sont pas clairs. Une modulation de la concentration des acteurs du SRAA et notamment de l'angiotensine 2 est l'hypothèse retenue actuellement. Cette hypothèse doit être confirmée par des études expérimentales et cliniques.

Bibliographie

Bibliographie

1. P. Ponikowski, A. A. Voors, S. D. Anker, H. Bueno, J. G. F. Cleland, A. J. S. Coats, V. Falk, J. R. González-Juanatey, V.-P. Harjola, E. A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J. T. Parissis, B. Pieske, J. P. Riley, G. M. C. Rosano, L. M. Ruilope, F. Ruschitzka, F. H. Rutten, P. van der Meer, ESC Scientific Document Group, 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *Eur. Heart J.* **37**, 2129–2200 (2016).
2. T. J. Wang, J. C. Evans, E. J. Benjamin, D. Levy, E. C. LeRoy, R. S. Vasan, Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community, *Circulation* **108**, 977–982 (2003).
3. SOLVD Investigators, S. Yusuf, B. Pitt, C. E. Davis, W. B. Hood, J. N. Cohn, Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions, *N. Engl. J. Med.* **327**, 685–691 (1992).
4. A. P. Ambrosy, G. C. Fonarow, J. Butler, O. Chioncel, S. J. Greene, M. Vaduganathan, S. Nodari, C. S. P. Lam, N. Sato, A. N. Shah, M. Gheorghiu, The Global Health and Economic Burden of Hospitalizations for Heart Failure, *Journal of the American College of Cardiology* **63**, 1123–1133 (2014).
5. V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, E. J. Benjamin, J. D. Berry, W. B. Borden, D. M. Bravata, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, E. Z. Soliman, P. D. Sorlie, N. Sotoodehnia, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, M. B. Turner, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* **125**, e2–e220 (2012).
6. P. A. Heidenreich, N. M. Albert, L. A. Allen, D. A. Bluemke, J. Butler, G. C. Fonarow, J. S. Ikonomicis, O. Khavjou, M. A. Konstam, T. M. Maddox, G. Nichol, M. Pham, I. L. Piña, J. G. Trogon, American Heart Association Advocacy Coordinating Committee, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Clinical Cardiology, Council on Epidemiology and Prevention, Stroke Council, Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association, *Circ Heart Fail* **6**, 606–619 (2013).
7. K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J. J. V. McMurray, P. Ponikowski, P. A. Poole-Wilson, A. Strömberg, D. J. van Veldhuisen, D. Atar, A. W. Hoes, A. Keren, A. Mebazaa, M. Nieminen, S. G. Priori, K. Swedberg, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), *Eur. Heart J.* **29**, 2388–2442 (2008).
8. S. Blecker, M. Paul, G. Taksler, G. Ogedegbe, S. Katz, Heart failure–associated hospitalizations in the United States, *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 1259–1267 (2013).
9. F. Alla, F. Zannad, G. Filippatos, Epidemiology of acute heart failure syndromes, *Heart Fail Rev* **12**, 91–95 (2007).

10. F. Zannad, N. Agrinier, F. Alla, Heart failure burden and therapy, *Europace* **11 Suppl 5**, v1-9 (2009).
11. M. Galvao, J. Kalman, T. DeMarco, G. C. Fonarow, C. Galvin, J. K. Ghali, R. M. Moskowitz, Gender differences in in-hospital management and outcomes in patients with decompensated heart failure: analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE), *J. Card. Fail.* **12**, 100–107 (2006).
12. E. M. Hsich, M. V. Grau-Sepulveda, A. F. Hernandez, E. D. Peterson, L. H. Schwamm, D. L. Bhatt, G. C. Fonarow, Sex differences in in-hospital mortality in acute decompensated heart failure with reduced and preserved ejection fraction, *Am. Heart J.* **163**, 430–437, 437.e1–3 (2012).
13. C. W. Yancy, M. Lopatin, L. W. Stevenson, T. De Marco, G. C. Fonarow, ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators, Clinical presentation, management, and in-hospital outcomes of patients admitted with acute decompensated heart failure with preserved systolic function: a report from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database, *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 76–84 (2006).
14. S. J. Shah, M. Gheorghiade, Heart failure with preserved ejection fraction: treat now by treating comorbidities, *JAMA* **300**, 431–433 (2008).
15. G. C. Fonarow, W. G. Stough, W. T. Abraham, N. M. Albert, M. Gheorghiade, B. H. Greenberg, C. M. O’Connor, J. L. Sun, C. W. Yancy, J. B. Young, OPTIMIZE-HF Investigators and Hospitals, Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry, *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 768–777 (2007).
16. B. A. Steinberg, X. Zhao, P. A. Heidenreich, E. D. Peterson, D. L. Bhatt, C. P. Cannon, A. F. Hernandez, G. C. Fonarow, Get With the Guidelines Scientific Advisory Committee and Investigators, Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes, *Circulation* **126**, 65–75 (2012).
17. J. L. Van Herck, M. J. Claeys, R. De Paep, P. L. Van Herck, C. J. Vrints, P. G. Jorens, Management of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* **4**, 278–297 (2015).
18. A. Mebazaa, A. Combes, S. van Diepen, A. Hollinger, J. N. Katz, G. Landoni, L. A. Hajjar, J. Lassus, G. Lebreton, G. Montalescot, J. J. Park, S. Price, A. Sionis, D. Yannopoulos, V.-P. Harjola, B. Levy, H. Thiele, Management of cardiogenic shock complicating myocardial infarction, *Intensive Care Med* **44**, 760–773 (2018).
19. L. A. Sleeper, K. Ramanathan, M. H. Picard, T. H. Lejemtel, H. D. White, V. Dzavik, D. Tormey, N. E. Avis, J. S. Hochman, SHOCK Investigators, Functional status and quality of life after emergency revascularization for cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 266–273 (2005).
20. K. L. Neuhaus, R. von Essen, U. Tebbe, A. Vogt, M. Roth, M. Riess, W. Niederer, F. Forycki, A. Wirtzfeld, W. Maeurer, Improved thrombolysis in acute myocardial infarction with front-loaded administration of alteplase: results of the rt-PA-APSAC patency study (TAPS), *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 885–891 (1992).
21. R. G. Wilcox, G. von der Lippe, C. G. Olsson, G. Jensen, A. M. Skene, J. R. Hampton, Trial of tissue plasminogen activator for mortality reduction in acute myocardial infarction. Anglo-Scandinavian Study of Early Thrombolysis (ASSET), *Lancet* **2**, 525–530 (1988).

22. R. J. Goldberg, N. A. Samad, J. Yarzebski, J. Gurwitz, C. Bigelow, J. M. Gore, Temporal trends in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* **340**, 1162–1168 (1999).
23. M. Y. Khashan, M. R. Pinsky, Does intra-aortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock improve outcome?, *Crit Care* **17**, 307 (2013).
24. D. Kolte, S. Khera, W. S. Aronow, M. Mujib, C. Palaniswamy, S. Sule, D. Jain, W. Gotsis, A. Ahmed, W. H. Frishman, G. C. Fonarow, Trends in incidence, management, and outcomes of cardiogenic shock complicating ST-elevation myocardial infarction in the United States, *J Am Heart Assoc* **3**, e000590 (2014).
25. J. S. Hochman, L. A. Sleeper, J. G. Webb, V. Dzavik, C. E. Buller, P. Aylward, J. Col, H. D. White, SHOCK Investigators, Early revascularization and long-term survival in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *JAMA* **295**, 2511–2515 (2006).
26. M. Singh, J. White, D. Hasdai, P. K. Hodgson, P. B. Berger, E. J. Topol, R. M. Califf, D. R. Holmes, Long-term outcome and its predictors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction complicated by shock: insights from the GUSTO-I trial, *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1752–1758 (2007).
27. C. W. Seymour, D. C. Angus, Making a pragmatic choice for fluid resuscitation in critically ill patients, *JAMA* **310**, 1803–1804 (2013).
28. ANSM, Solutions pour perfusion à based-hydroxyethylamidon (HEA), nouvelles mesures visant à renforcer les restrictions existantes (available at ansm.sante.fr).
29. V. Léopold, E. Gayat, R. Pirracchio, J. Spinar, J. Parenica, T. Tarvasmäki, J. Lassus, V.-P. Harjola, S. Champion, F. Zannad, S. Valente, P. Urban, H.-R. Chua, R. Bellomo, B. Popovic, D. M. Ouweneel, J. P. S. Henriques, G. Simonis, B. Lévy, A. Kimmoun, P. Gaudard, M. B. Basir, A. Markota, C. Adler, H. Reuter, A. Mebazaa, T. Chouihed, Epinephrine and short-term survival in cardiogenic shock: an individual data meta-analysis of 2583 patients, *Intensive Care Med* **44**, 847–856 (2018).
30. B. Levy, P. Perez, J. Perny, C. Thivillier, A. Gerard, Comparison of norepinephrine-dobutamine to epinephrine for hemodynamics, lactate metabolism, and organ function variables in cardiogenic shock. A prospective, randomized pilot study, *Crit. Care Med.* **39**, 450–455 (2011).
31. B. Levy, R. Clere-Jehl, A. Legras, T. Morichau-Beauchant, M. Leone, G. Frederique, J.-P. Quenot, A. Kimmoun, A. Cariou, J. Lassus, V.-P. Harjola, F. Meziani, G. Louis, P. Rossignol, K. Duarte, N. Girerd, A. Mebazaa, P. Vignon, Collaborators, Epinephrine Versus Norepinephrine for Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 173–182 (2018).
32. D. De Backer, P. Biston, J. Devriendt, C. Madl, D. Chochrad, C. Aldecoa, A. Brasseur, P. Defrance, P. Gottignies, J.-L. Vincent, SOAP II Investigators, Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock, *N. Engl. J. Med.* **362**, 779–789 (2010).
33. W. T. Abraham, K. F. Adams, G. C. Fonarow, M. R. Costanzo, R. L. Berkowitz, T. H. LeJemtel, M. L. Cheng, J. Wynne, ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators, ADHERE Study Group, In-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure requiring intravenous vasoactive medications: an analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE), *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 57–64 (2005).
34. G. Koster, H. J. Bekema, J. Wetterslev, C. Gluud, F. Keus, I. C. C. van der Horst, Milrinone for cardiac dysfunction in critically ill adult patients: a systematic review of randomised clinical trials with meta-analysis and trial sequential analysis, *Intensive Care Med* **42**, 1322–1335 (2016).

35. S. Bouchez, F. Fedele, G. Giannakoulas, F. Gustafsson, V.-P. Harjola, K. Karason, M. Kivikko, D. von Lewinski, F. Oliva, Z. Papp, J. Parissis, P. Pollesello, G. Pözl, C. Tschöpe, Levosimendan in Acute and Advanced Heart Failure: an Expert Perspective on Posology and Therapeutic Application, *Cardiovasc Drugs Ther* **32**, 617–624 (2018).
36. R. H. Mehta, J. H. Alexander, LEVO-CTS Steering Committee Members and Trial Investigators, Levosimendan in Cardiac Surgery, *N. Engl. J. Med.* **377**, 1900–1901 (2017).
37. M. S. Nieminen, M. Buerke, A. Cohen-Solál, S. Costa, I. Édes, A. Erlikh, F. Franco, C. Gibson, V. Gorjup, F. Guarracino, F. Gustafsson, V.-P. Harjola, T. Husebye, K. Karason, I. Katsytadze, S. Kaul, M. Kivikko, G. Marezi, J. Masip, S. Matskeplishvili, A. Mebazaa, J. E. Møller, J. Nessler, B. Nessler, A. Ntalianis, F. Oliva, E. Pichler-Cetin, P. Pöder, A. Recio-Mayoral, S. Rex, R. Rokyta, R. H. Strasser, E. Zima, P. Pollesello, The role of levosimendan in acute heart failure complicating acute coronary syndrome: A review and expert consensus opinion, *Int. J. Cardiol.* **218**, 150–157 (2016).
38. J. Altenberger, F. Gustafsson, V.-P. Harjola, K. Karason, D. Kindgen-Milles, M. Kivikko, G. Malfatto, Z. Papp, J. Parissis, P. Pollesello, G. Pözl, C. Tschöpe, Levosimendan in Acute and Advanced Heart Failure: An Appraisal of the Clinical Database and Evaluation of Its Therapeutic Applications, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **71**, 129–136 (2018).
39. M. M. Givertz, C. Andreou, C. H. Conrad, W. S. Colucci, Direct myocardial effects of levosimendan in humans with left ventricular dysfunction: alteration of force-frequency and relaxation-frequency relationships, *Circulation* **115**, 1218–1224 (2007).
40. J. T. Fuhrmann, A. Schmeisser, M. R. Schulze, C. Wunderlich, S. P. Schoen, T. Rauwolf, C. Weinbrenner, R. H. Strasser, Levosimendan is superior to enoximone in refractory cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *Crit. Care Med.* **36**, 2257–2266 (2008).
41. M. Fang, H. Cao, Z. Wang, Levosimendan in patients with cardiogenic shock complicating myocardial infarction: A meta-analysis, *Med Intensiva* **42**, 409–415 (2018).
42. T. Tarvasmäki, J. Lassus, M. Varpula, A. Sionis, R. Sund, L. Køber, J. Spinar, J. Parissis, M. Banaszewski, J. Silva Cardoso, V. Carubelli, S. Di Somma, A. Mebazaa, V.-P. Harjola, CardShock study investigators, Current real-life use of vasopressors and inotropes in cardiogenic shock - adrenaline use is associated with excess organ injury and mortality, *Crit Care* **20**, 208 (2016).
43. S. Jolly, G. Newton, E. Horlick, P. H. Seidelin, H. J. Ross, M. Husain, V. Dzavik, Effect of vasopressin on hemodynamics in patients with refractory cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.* **96**, 1617–1620 (2005).
44. TRIUMPH Investigators, J. H. Alexander, H. R. Reynolds, A. L. Stebbins, V. Dzavik, R. A. Harrington, F. Van de Werf, J. S. Hochman, Effect of tilarginine acetate in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock: the TRIUMPH randomized controlled trial, *JAMA* **297**, 1657–1666 (2007).
45. M. Gheorghide, J. E. A. Blair, G. S. Filippatos, C. Macarie, W. Ruzyllo, J. Korewicki, S. I. Bubenek-Turconi, M. Ceracchi, M. Bianchetti, P. Carminati, D. Kremastinos, G. Valentini, H. N. Sabbah, HORIZON-HF Investigators, Hemodynamic, echocardiographic, and neurohormonal effects of istaroxime, a novel intravenous inotropic and lusitropic agent: a randomized controlled trial in patients hospitalized with heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 2276–2285 (2008).
46. A. Mebazaa, J. Motiejunaite, E. Gayat, M. G. Crespo-Leiro, L. H. Lund, A. P. Maggioni, O. Chioncel, E. Akiyama, V.-P. Harjola, P. Seferovic, C. Laroche, M. S. Julve, E. Roig, F. Ruschitzka, G. Filippatos, ESC Heart Failure Long-Term Registry Investigators, Long-term safety of intravenous

cardiovascular agents in acute heart failure: results from the European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry, *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 332–341 (2018).

47. S. van Diepen, J. N. Katz, N. M. Albert, T. D. Henry, A. K. Jacobs, N. K. Kapur, A. Kilic, V. Menon, E. M. Ohman, N. K. Sweitzer, H. Thiele, J. B. Washam, M. G. Cohen, American Heart Association Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Quality of Care and Outcomes Research; and Mission: Lifeline, Contemporary Management of Cardiogenic Shock: A Scientific Statement From the American Heart Association, *Circulation* **136**, e232–e268 (2017).

48. J. S. Hochman, L. A. Sleeper, J. G. Webb, T. A. Sanborn, H. D. White, J. D. Talley, C. E. Buller, A. K. Jacobs, J. N. Slater, J. Col, S. M. McKinlay, T. H. LeJemtel, Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock, *N. Engl. J. Med.* **341**, 625–634 (1999).

49. B. Ibanez, S. James, S. Agewall, M. J. Antunes, C. Bucciarelli-Ducci, H. Bueno, A. L. P. Caforio, F. Crea, J. A. Goudevenos, S. Halvorsen, G. Hindricks, A. Kastrati, M. J. Lenzen, E. Prescott, M. Roffi, M. Valgimigli, C. Varenhorst, P. Vranckx, P. Widimský, ESC Scientific Document Group, 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.* **39**, 119–177 (2018).

50. M. Roffi, C. Patrono, J.-P. Collet, C. Mueller, M. Valgimigli, F. Andreotti, J. J. Bax, M. A. Borger, C. Brotons, D. P. Chew, B. Gencer, G. Hasenfuss, K. Kjeldsen, P. Lancellotti, U. Landmesser, J. Mehilli, D. Mukherjee, R. F. Storey, S. Windecker, ESC Scientific Document Group, 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC), *Eur. Heart J.* **37**, 267–315 (2016).

51. R. V. Jeger, D. Radovanovic, P. R. Hunziker, M. E. Pfisterer, J.-C. Stauffer, P. Erne, P. Urban, AMIS Plus Registry Investigators, Ten-year trends in the incidence and treatment of cardiogenic shock, *Ann. Intern. Med.* **149**, 618–626 (2008).

52. R. J. Goldberg, F. A. Spencer, J. M. Gore, D. Lessard, J. Yarzebski, Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective, *Circulation* **119**, 1211–1219 (2009).

53. R. H. Mehta, R. D. Lopes, A. Ballotta, A. Frigiola, M. H. Sketch, E. Bossone, E. R. Bates, Percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass surgery for cardiogenic shock and multivessel coronary artery disease?, *Am. Heart J.* **159**, 141–147 (2010).

54. H. D. White, S. F. Assmann, T. A. Sanborn, A. K. Jacobs, J. G. Webb, L. A. Sleeper, C.-K. Wong, J. T. Stewart, P. E. G. Aylward, S.-C. Wong, J. S. Hochman, Comparison of percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: results from the Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock (SHOCK) trial, *Circulation* **112**, 1992–2001 (2005).

55. H. Thiele, U. Zeymer, F.-J. Neumann, M. Ferenc, H.-G. Olbrich, J. Hausleiter, G. Richardt, M. Hennersdorf, K. Empen, G. Fuernau, S. Desch, I. Eitel, R. Hambrecht, J. Fuhrmann, M. Böhm, H. Ebel, S. Schneider, G. Schuler, K. Werdan, IABP-SHOCK II Trial Investigators, Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock, *N. Engl. J. Med.* **367**, 1287–1296 (2012).

56. M. Shah, S. Patnaik, B. Patel, P. Ram, L. Garg, M. Agarwal, S. Agrawal, S. Arora, N. Patel, J. Wald, U. P. Jorde, Trends in mechanical circulatory support use and hospital mortality among patients with acute myocardial infarction and non-infarction related cardiogenic shock in the United States, *Clin Res Cardiol* **107**, 287–303 (2018).
57. A. Sandhu, L. A. McCoy, S. I. Negi, I. Hameed, P. Atri, S. J. Al'Aref, J. Curtis, E. McNulty, H. V. Anderson, A. Shroff, M. Menegus, R. V. Swaminathan, H. Gurm, J. Messenger, T. Wang, S. M. Bradley, Use of mechanical circulatory support in patients undergoing percutaneous coronary intervention: insights from the National Cardiovascular Data Registry, *Circulation* **132**, 1243–1251 (2015).
58. H. Thiele, A. Jobs, D. M. Ouweneel, J. P. S. Henriques, M. Seyfarth, S. Desch, I. Eitel, J. Pöss, G. Fuernau, S. de Waha, Percutaneous short-term active mechanical support devices in cardiogenic shock: a systematic review and collaborative meta-analysis of randomized trials, *Eur. Heart J.* **38**, 3523–3531 (2017).
59. J. E. Gotts, M. A. Matthay, Sepsis: pathophysiology and clinical management, *BMJ* **353**, i1585 (2016).
60. M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, D. C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
61. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, *Crit. Care Med.* **20**, 864–874 (1992).
62. M. Cecconi, L. Evans, M. Levy, A. Rhodes, Sepsis and septic shock, *Lancet* **392**, 75–87 (2018).
63. N. K. J. Adhikari, R. A. Fowler, S. Bhagwanjee, G. D. Rubenfeld, Critical care and the global burden of critical illness in adults, *Lancet* **376**, 1339–1346 (2010).
64. D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, M. R. Pinsky, Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, *Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).
65. A. Rhodes, L. E. Evans, W. Alhazzani, M. M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, M. E. Nunnally, B. Rochwerg, G. D. Rubenfeld, D. C. Angus, D. Annane, R. J. Beale, G. J. Bellingham, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. Coopersmith, D. P. De Backer, C. J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J. L. Hidalgo, S. M. Hollenberg, A. E. Jones, D. R. Karnad, R. M. Kleinpell, Y. Koh, T. C. Lisboa, F. R. Machado, J. J. Marini, J. C. Marshall, J. E. Mazuski, L. A. McIntyre, A. S. McLean, S. Mehta, R. P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T. M. Osborn, A. Perner, C. M. Plunkett, M. Ranieri, C. A. Schorr, M. A. Seckel, C. W. Seymour, L. Shieh, K. A. Shukri, S. Q. Simpson, M. Singer, B. T. Thompson, S. R. Townsend, T. Van der Poll, J.-L. Vincent, W. J. Wiersinga, J. L. Zimmerman, R. P. Dellinger, Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016, *Intensive Care Med* (2017), doi:10.1007/s00134-017-4683-6.
66. M. M. Levy, A. Artigas, G. S. Phillips, A. Rhodes, R. Beale, T. Osborn, J.-L. Vincent, S. Townsend, S. Lemeshow, R. P. Dellinger, Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study, *Lancet Infect Dis* **12**, 919–924 (2012).

67. V. Liu, G. J. Escobar, J. D. Greene, J. Soule, A. Whippy, D. C. Angus, T. J. Iwashyna, Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts, *JAMA* **312**, 90–92 (2014).
68. D. C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N. Engl. J. Med.* **369**, 2063 (2013).
69. G. Kumar, N. Kumar, A. Taneja, T. Kaleekal, S. Tarima, E. McGinley, E. Jimenez, A. Mohan, R. A. Khan, J. Whittle, E. Jacobs, R. Nanchal, Milwaukee Initiative in Critical Care Outcomes Research (MICCOR) Group of Investigators, Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007), *Chest* **140**, 1223–1231 (2011).
70. R. R. Ehrman, A. N. Sullivan, M. J. Favot, R. L. Sherwin, C. A. Reynolds, A. Abidov, P. D. Levy, Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature, *Crit Care* **22**, 112 (2018).
71. M. M. Parker, J. H. Shelhamer, S. L. Bacharach, M. V. Green, C. Natanson, T. M. Frederick, B. A. Damske, J. E. Parrillo, Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock, *Ann. Intern. Med.* **100**, 483–490 (1984).
72. R. D. Weisel, L. Vito, R. C. Dennis, C. R. Valeri, H. B. Hechtman, Myocardial depression during sepsis, *Am. J. Surg.* **133**, 512–521 (1977).
73. J. Charpentier, C.-E. Luyt, Y. Fulla, C. Vinsonneau, A. Cariou, S. Grabar, J.-F. Dhainaut, J.-P. Mira, J.-D. Chiche, Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis, *Crit. Care Med.* **32**, 660–665 (2004).
74. J. Poelaert, C. Declerck, D. Vogelaers, F. Colardyn, C. A. Visser, Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock, *Intensive Care Med* **23**, 553–560 (1997).
75. Y. Kakihana, T. Ito, M. Nakahara, K. Yamaguchi, T. Yasuda, Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management, *J Intensive Care* **4**, 22 (2016).
76. S. L. Zanotti-Cavazzoni, S. M. Hollenberg, Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock, *Curr Opin Crit Care* **15**, 392–397 (2009).
77. J. A. Russell, J. Boyd, T. Nakada, S. Thair, K. R. Walley, Molecular mechanisms of sepsis, *Contrib Microbiol* **17**, 48–85 (2011).
78. A. Conway-Morris, J. Wilson, M. Shankar-Hari, Immune Activation in Sepsis, *Crit Care Clin* **34**, 29–42 (2018).
79. F. D. Bruni, P. Komwatana, M. E. Soulsby, M. L. Hess, Endotoxin and myocardial failure: role of the myofibril and venous return, *Am. J. Physiol.* **235**, H150-156 (1978).
80. R. E. Cunnion, G. L. Schaer, M. M. Parker, C. Natanson, J. E. Parrillo, The coronary circulation in human septic shock, *Circulation* **73**, 637–644 (1986).
81. R. Sato, M. Nasu, A review of sepsis-induced cardiomyopathy, *J Intensive Care* **3**, 48 (2015).
82. W. S. Madorin, T. Rui, N. Sugimoto, O. Handa, G. Cepinskas, P. R. Kvietys, Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC, *Circ. Res.* **94**, 944–951 (2004).
83. A. Rudiger, M. Singer, Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction, *Crit. Care Med.* **35**, 1599–1608 (2007).

84. M. R. N. Celes, D. Torres-Dueñas, L. M. Malvestio, V. Blefari, E. C. Campos, S. G. Ramos, C. M. Prado, F. Q. Cunha, M. A. Rossi, Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis, *Lab. Invest.* **90**, 531–542 (2010).
85. J. E. Parrillo, C. Burch, J. H. Shelhamer, M. M. Parker, C. Natanson, 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, *J. Clin. Invest.* **76**, 1539–1553 (1985).
86. A. Kumar, V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, J. E. Parrillo, Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum, *J. Exp. Med.* **183**, 949–958 (1996).
87. A. Mebazaa, Are platelets a “forgotten” source of sepsis-induced myocardial depressing factor(s)?, *Crit Care* **12**, 110 (2008).
88. J. M. Reilly, R. E. Cunnion, C. Burch-Whitman, M. M. Parker, J. H. Shelhamer, J. E. Parrillo, A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock, *Chest* **95**, 1072–1080 (1989).
89. U. Sagher, H. Rosen, O. Sarel, Y. Becker, Studies on a pancreatic cardiodepressant factor, *Circ. Shock* **19**, 319–327 (1986).
90. C. Benassayag, N. Christeff, M. C. Auclair, C. Vernimmen, C. Carli-Vielle, E. Nunez, A. Carli, Early released lipid-soluble cardiodepressant factor and elevated oestrogenic substances in human septic shock, *Eur. J. Clin. Invest.* **14**, 288–294 (1984).
91. J. L. Balligand, D. Ungureanu, R. A. Kelly, L. Kobzik, D. Pimental, T. Michel, T. W. Smith, Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium, *J. Clin. Invest.* **91**, 2314–2319 (1993).
92. J. C. Mercier, F. Beaufile, J. F. Hartmann, D. Azéma, Hemodynamic patterns of meningococcal shock in children, *Crit. Care Med.* **16**, 27–33 (1988).
93. N. Pathan, C. Sandiford, S. E. Harding, M. Levin, Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia, *Crit. Care Med.* **30**, 2191–2198 (2002).
94. N. Pathan, C. A. Hemingway, A. A. Alizadeh, A. C. Stephens, J. C. Boldrick, E. E. Oragui, C. McCabe, S. B. Welch, A. Whitney, P. O’Gara, S. Nadel, D. A. Relman, S. E. Harding, M. Levin, Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock, *Lancet* **363**, 203–209 (2004).
95. M. Odeh, Tumor necrosis factor-alpha as a myocardial depressant substance, *Int. J. Cardiol.* **42**, 231–238 (1993).
96. M. S. Finkel, C. V. Oddis, T. D. Jacob, S. C. Watkins, B. G. Hattler, R. L. Simmons, Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide, *Science* **257**, 387–389 (1992).
97. L. B. Garner, M. S. Willis, D. L. Carlson, J. M. DiMaio, M. D. White, D. J. White, G. A. Adams, J. W. Horton, B. P. Giroir, Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H2500-2509 (2003).
98. M. Bozza, A. R. Satoskar, G. Lin, B. Lu, A. A. Humbles, C. Gerard, J. R. David, Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis, *J. Exp. Med.* **189**, 341–346 (1999).

99. T. Calandra, B. Echtenacher, D. L. Roy, J. Pugin, C. N. Metz, L. Hültner, D. Heumann, D. Männel, R. Bucala, M. P. Glauser, Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor, *Nat. Med.* **6**, 164–170 (2000).
100. A. Blet, B. Deniau, C. Geven, M. Sadoune, A. Caillard, P.-R. Kounde, E. Polidano, P. Pickkers, J.-L. Samuel, A. Mebazaa, Adrecizumab, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats, *Intensive Care Med Exp* **7**, 25 (2019).
101. J.-M. Hyvelin, Q. Shan, J.-P. Bourreau, Adrenomedullin: a cardiac depressant factor in septic shock, *J Card Surg* **17**, 328–335 (2002).
102. A. Kumar, B. Paladugu, J. Mensing, A. Kumar, J. E. Parrillo, Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha -induced depression of cardiac myocyte contractility, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R1900-1906 (2007).
103. R. E. Schmieder, K. F. Hilgers, M. P. Schlaich, B. M. W. Schmidt, Renin-angiotensin system and cardiovascular risk, *Lancet* **369**, 1208–1219 (2007).
104. G. Sayer, G. Bhat, The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure, *Cardiol Clin* **32**, 21–32, vii (2014).
105. Heart Failure Society of America, J. Lindenfeld, N. M. Albert, J. P. Boehmer, S. P. Collins, J. A. Ezekowitz, M. M. Givertz, S. D. Katz, M. Klapholz, D. K. Moser, J. G. Rogers, R. C. Starling, W. G. Stevenson, W. H. W. Tang, J. R. Teerlink, M. N. Walsh, HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline, *J. Card. Fail.* **16**, e1-194 (2010).
106. J. J. V. McMurray, S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Böhm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Køber, G. Y. H. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Rønnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher, Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, T. McDonagh, U. Sechtem, L. A. Bonet, P. Avraamides, H. A. Ben Lamin, M. Brignole, A. Coca, P. Cowburn, H. Dargie, P. Elliott, F. A. Flachskampf, G. F. Guida, S. Hardman, B. Jung, B. Merkely, C. Mueller, J. N. Nanas, O. W. Nielsen, S. Orn, J. T. Parissis, P. Ponikowski, ESC Committee for Practice Guidelines, ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 803–869 (2012).
107. H. A. Bock, M. Hermlé, F. P. Brunner, G. Thiel, Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli, *Kidney Int.* **41**, 275–280 (1992).
108. H. Urata, B. Healy, R. W. Stewart, F. M. Bumpus, A. Husain, Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts, *Circ. Res.* **66**, 883–890 (1990).
109. H. Urata, A. Kinoshita, K. S. Misono, F. M. Bumpus, A. Husain, Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart, *J. Biol. Chem.* **265**, 22348–22357 (1990).
110. C. M. Ferrario, Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation, *Hypertension* **47**, 515–521 (2006).

111. M. de Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, T. Unger, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacol. Rev.* **52**, 415–472 (2000).
112. M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R. E. Breitbart, S. Acton, A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9, *Circ. Res.* **87**, E1-9 (2000).
113. W. Lieb, J. Graf, A. Götz, I. R. König, B. Mayer, M. Fischer, J. Stritzke, C. Hengstenberg, S. R. Holmer, A. Döring, H. Löwel, H. Schunkert, J. Erdmann, Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy, *J. Mol. Med.* **84**, 88–96 (2006).
114. R. M. Carey, Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age, *Hypertension* **45**, 840–844 (2005).
115. Y. Imai, K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, M. A. Crackower, A. Fukamizu, C.-C. Hui, L. Hein, S. Uhlig, A. S. Slutsky, C. Jiang, J. M. Penninger, Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure, *Nature* **436**, 112–116 (2005).
116. G. Wolf, U. Wenzel, K. D. Burns, R. C. Harris, R. A. K. Stahl, F. Thaiss, Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors, *Kidney Int.* **61**, 1986–1995 (2002).
117. V. Esteban, O. Lorenzo, M. Rupérez, Y. Suzuki, S. Mezzano, J. Blanco, M. Kretzler, T. Sugaya, J. Egido, M. Ruiz-Ortega, Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction, *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1514–1529 (2004).
118. E. Kostenis, G. Milligan, A. Christopoulos, C. F. Sanchez-Ferrer, S. Heringer-Walther, P. M. Sexton, F. Gembardt, E. Kellett, L. Martini, P. Vanderheyden, H.-P. Schultheiss, T. Walther, G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor, *Circulation* **111**, 1806–1813 (2005).
119. R. A. S. Santos, A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. R. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. V. B. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H.-P. Schultheiss, R. Speth, T. Walther, Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8258–8263 (2003).
120. E. J. Freeman, G. M. Chisolm, C. M. Ferrario, E. A. Tallant, Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth, *Hypertension* **28**, 104–108 (1996).
121. M. Stoll, U. M. Steckelings, M. Paul, S. P. Bottari, R. Metzger, T. Unger, The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells, *J. Clin. Invest.* **95**, 651–657 (1995).
122. S. Y. Chai, R. Fernando, G. Peck, S.-Y. Ye, F. a. O. Mendelsohn, T. A. Jenkins, A. L. Albiston, The angiotensin IV/AT4 receptor, *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2728–2737 (2004).
123. A. H. J. Danser, J. Deinum, Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor, *Hypertension* **46**, 1069–1076 (2005).
124. G. Nguyen, F. Delarue, C. Burcklé, L. Bouzahir, T. Giller, J.-D. Sraer, Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J. Clin. Invest.* **109**, 1417–1427 (2002).

125. C. A. Burcklé, A. H. Jan Danser, D. N. Müller, I. M. Garrelds, J.-M. Gasc, E. Popova, R. Plehm, J. Peters, M. Bader, G. Nguyen, Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats, *Hypertension* **47**, 552–556 (2006).
126. J. Hartupee, D. L. Mann, Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction, *Nat Rev Cardiol* **14**, 30–38 (2017).
127. F. Rossi, A. Mascolo, V. Mollace, The pathophysiological role of natriuretic peptide-RAAS cross talk in heart failure, *Int. J. Cardiol.* **226**, 121–125 (2017).
128. C. Orsborne, P. S. Chaggar, S. M. Shaw, S. G. Williams, The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future, *Postgrad Med J* **93**, 29–37 (2017).
129. G. Olivetti, R. Abbi, F. Quaini, J. Kajstura, W. Cheng, J. A. Nitahara, E. Quaini, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, S. Krajewski, J. C. Reed, P. Anversa, Apoptosis in the failing human heart, *N. Engl. J. Med.* **336**, 1131–1141 (1997).
130. F. Triposkiadis, G. Karayannis, G. Giamouzis, J. Skoularigis, G. Louridas, J. Butler, The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications, *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 1747–1762 (2009).
131. V. Piacentino, C. R. Weber, X. Chen, J. Weisser-Thomas, K. B. Margulies, D. M. Bers, S. R. Houser, Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes, *Circ. Res.* **92**, 651–658 (2003).
132. C. A. Rolih, K. P. Ober, The endocrine response to critical illness, *Med. Clin. North Am.* **79**, 211–224 (1995).
133. R. W. Schrier, W. Wang, Acute renal failure and sepsis, *N. Engl. J. Med.* **351**, 159–169 (2004).
134. D. R. Salgado, J. R. Rocco, E. Silva, J.-L. Vincent, Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach?, *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 11–20 (2010).
135. D. du Cheyron, A. Lesage, C. Daubin, M. Ramakers, P. Charbonneau, Hyperreninemic hypoaldosteronism: a possible etiological factor of septic shock-induced acute renal failure, *Intensive Care Med* **29**, 1703–1709 (2003).
136. J. Boldt, M. Papsdorf, B. Kumle, S. Piper, G. Hempelmann, Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on endothelial-derived substances in the critically ill, *Crit. Care Med.* **26**, 1663–1670 (1998).
137. M. Bucher, K. P. Ittner, J. Hobbhahn, K. Taeger, A. Kurtz, Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis, *Hypertension* **38**, 177–182 (2001).
138. C. W. Dunn, J. W. Horton, Role of angiotensin II in neonatal sepsis, *Circ. Shock* **40**, 144–150 (1993).
139. U. Hilgenfeldt, G. Kienapfel, W. Kellermann, R. Schott, M. Schmidt, Renin-angiotensin system in sepsis, *Clin Exp Hypertens A* **9**, 1493–1504 (1987).
140. G. M. Wray, J. H. Coakley, Severe septic shock unresponsive to noradrenaline, *Lancet* **346**, 1604 (1995).

141. C. Adembri, E. Kastamoniti, I. Bertolozzi, S. Vanni, W. Dorigo, M. Coppo, C. Pratesi, A. R. De Gaudio, G. F. Gensini, P. A. Modesti, Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery, *Crit. Care Med.* **32**, 1170–1177 (2004).
142. A. D. Cumming, A. A. Driedger, J. W. McDonald, R. M. Lindsay, K. Solez, A. L. Linton, Vasoactive hormones in the renal response to systemic sepsis, *Am. J. Kidney Dis.* **11**, 23–32 (1988).
143. R. Bellomo, C. Ronco, J. A. Kellum, R. L. Mehta, P. Palevsky, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup, Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group, *Crit Care* **8**, R204-212 (2004).
144. A. Aneman, J. Bengtsson, J. Snygg, M. Holm, A. Pettersson, L. Fändriks, Differentiation of the peptidergic vasoregulatory response to standardized splanchnic hypoperfusion by acute hypovolaemia or sepsis in anaesthetized pigs, *Acta Physiol. Scand.* **166**, 293–300 (1999).
145. J. E. Parrillo, Pathogenetic mechanisms of septic shock, *N. Engl. J. Med.* **328**, 1471–1477 (1993).
146. G. A. Fox, N. A. Paterson, D. G. McCormack, Effect of inhibition of NO synthase on vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis, *Am. J. Physiol.* **267**, H1377-1382 (1994).
147. M. Bucher, J. Hobbhahn, A. Kurtz, Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis, *Crit. Care Med.* **29**, 1750–1755 (2001).
148. D. Martineau, S. Lamouche, R. Briand, N. Yamaguchi, Functional involvement of angiotensin AT2 receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77**, 367–374 (1999).
149. L. W. Dong, Y. Z. Chang, L. J. Tong, J. Tang, J. Y. Su, C. S. Tang, Role of regulatory peptide in pathogenesis of shock, *Sci. China, Ser. B, Chem. Life Sci. Earth Sci.* **37**, 162–169 (1994).
150. S. Yasuda, W. Y. Lew, Angiotensin II exacerbates lipopolysaccharide-induced contractile depression in rabbit cardiac myocytes, *Am. J. Physiol.* **276**, H1442-1449 (1999).
151. C. R. Newton, B. Curran, G. P. Victorino, Angiotensin II type 1 receptor activation increases microvascular permeability via a calcium dependent process, *J. Surg. Res.* **123**, 33–39 (2005).
152. D. A. Duprez, Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review, *J. Hypertens.* **24**, 983–991 (2006).
153. H. W. Kosterlitz, J. Hughes, Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand, *Life Sci.* **17**, 91–96 (1975).
154. J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris, Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity, *Nature* **258**, 577–580 (1975).
155. O. W. V. van den Brink, L. M. Delbridge, F. L. Rosenfeldt, D. Penny, D. S. Esmore, D. Quick, D. M. Kaye, S. Pepe, Endogenous cardiac opioids: enkephalins in adaptation and protection of the heart, *Heart Lung Circ* **12**, 178–187 (2003).
156. J. W. Holaday, Cardiovascular effects of endogenous opiate systems, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 541–594 (1983).
157. J. Tang, H. Y. Yang, E. Costa, Distribution of met5-enkephalin-Arg6-Phe7 (MEAP) in various tissues of rats and guinea pigs, *Life Sci.* **31**, 2303–2306 (1982).

158. R. C. Frederickson, Enkephalin pentapeptides--a review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission, *Life Sci.* **21**, 23–42 (1977).
159. S. Udenfriend, D. L. Kilpatrick, Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides, *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 309–323 (1983).
160. B. A. Barron, Opioid peptides and the heart, *Cardiovasc. Res.* **43**, 13–16 (1999).
161. B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghbir, T. Reisine, P. B. Bradley, P. S. Portoghese, M. Hamon, International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors, *Pharmacol. Rev.* **48**, 567–592 (1996).
162. K. E. Jackson, M. Farias, A. Stanfill, J. L. Caffrey, Delta opioid receptors inhibit vagal bradycardia in the sinoatrial node, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **6**, 385–393 (2001).
163. G. B. Stefano, B. Scharrer, E. M. Smith, T. K. Hughes, H. I. Magazine, T. V. Bilfinger, A. R. Hartman, G. L. Fricchione, Y. Liu, M. H. Makman, Opioid and opiate immunoregulatory processes, *Crit. Rev. Immunol.* **16**, 109–144 (1996).
164. L. I. Tsao, T. P. Su, Hibernation-induction peptide and cell death: [D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin blocks Bax-related apoptotic processes, *Eur. J. Pharmacol.* **428**, 149–151 (2001).
165. A. K. Baker, T. F. Meert, Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of mu, delta, and kappa opioid receptor subtypes on body temperature in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 1253–1264 (2002).
166. G. Wittert, P. Hope, D. Pyle, Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 877–881 (1996).
167. T. D. Giles, G. E. Sander, Mechanism of the cardiovascular response to systemic intravenous administration of leucine-enkephalin in the conscious dog, *Peptides* **4**, 171–175 (1983).
168. G. Feuerstein, A. L. Sirén, The opioid system in cardiac and vascular regulation of normal and hypertensive states, *Circulation* **75**, 1125–129 (1987).
169. G. Feuerstein, A. I. Faden, Differential cardiovascular effects of mu, delta and kappa opiate agonists at discrete hypothalamic sites in the anesthetized rat, *Life Sci.* **31**, 2197–2200 (1982).
170. S. P. Wilson, R. L. Klein, K. J. Chang, M. S. Gasparis, O. H. Viveros, W. H. Yang, Are opioid peptides co-transmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves?, *Nature* **288**, 707–709 (1980).
171. J. P. Springhorn, W. C. Claycomb, Translation of heart proenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes, *Am. J. Physiol.* **263**, H1560–1566 (1992).
172. A. Younès, S. Pepe, B. A. Barron, H. A. Spurgeon, E. G. Lakatta, J. L. Caffrey, Cardiac synthesis, processing, and coronary release of enkephalin-related peptides, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H1989–1998 (2000).
173. K. G. Low, R. G. Allen, M. H. Melner, Association of proenkephalin transcripts with polyribosomes in the heart, *Mol. Endocrinol.* **4**, 1408–1415 (1990).
174. R. D. Howells, D. L. Kilpatrick, L. C. Bailey, M. Noe, S. Udenfriend, Proenkephalin mRNA in rat heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1960–1963 (1986).

175. J. Weil, T. Eschenhagen, G. Fleige, C. Mittmann, E. Orthey, H. Scholz, Localization of preproenkephalin mRNA in rat heart: selective gene expression in left ventricular myocardium, *Am. J. Physiol.* **275**, H378-384 (1998).
176. Y. Semmoum, A. Younes, J. Coudert, Effects of ischemia on the metabolism of cardiac enkephalins, *Arch. Physiol. Biochem.* **109**, 18–23 (2001).
177. S. F. Atweh, M. J. Kuhar, Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla, *Brain Res.* **124**, 53–67 (1977).
178. S. P. Bell, M. N. Sack, A. Patel, L. H. Opie, D. M. Yellon, Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle, *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2296–2302 (2000).
179. S. A. Krumins, A. I. Faden, G. Feuerstein, Opiate binding in rat hearts: modulation of binding after hemorrhagic shock, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 120–128 (1985).
180. C. Ventura, L. Bastagli, P. Bernardi, C. M. Caldarera, C. Guarnieri, Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol, *Biochim. Biophys. Acta* **987**, 69–74 (1989).
181. K. K. Tai, W. Q. Jin, T. K. Chan, T. M. Wong, Characterization of [³H]U69593 binding sites in the rat heart by receptor binding assays, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**, 1297–1302 (1991).
182. W. M. Zhang, W. Q. Jin, T. M. Wong, Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 1547–1554 (1996).
183. R. Zimlichman, D. Gefel, H. Eliahou, Z. Matas, B. Rosen, S. Gass, C. Ela, Y. Eilam, Z. Vogel, J. Barg, Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats, *Circulation* **93**, 1020–1025 (1996).
184. A. Valtchanova-Matchouganska, J. a. O. Ojewole, Involvement of opioid delta (delta)- and kappa (kappa)-receptors in ischemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **24**, 139–144 (2002).
185. S. Pepe, R. P. Xiao, C. Hohl, R. Altschuld, E. G. Lakatta, “Cross talk” between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart, *Circulation* **95**, 2122–2129 (1997).
186. R. P. Xiao, S. Pepe, H. A. Spurgeon, M. C. Capogrossi, E. G. Lakatta, Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells, *Am. J. Physiol.* **272**, H797-805 (1997).
187. J. P. Headrick, L. E. See Hoe, E. F. Du Toit, J. N. Peart, Opioid receptors and cardioprotection - “opioidergic conditioning” of the heart, *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2026–2050 (2015).
188. P. Y. Law, Y. H. Wong, H. H. Loh, Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 389–430 (2000).
189. V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**, 531–556 (2013).
190. R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, H. B. Schiöth, The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
191. J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, How many drug targets are there?, *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993–996 (2006).

192. J. D. A. Tyndall, R. Sandilya, GPCR agonists and antagonists in the clinic, *Med Chem* **1**, 405–421 (2005).
193. A. J. Venkatakrishnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, M. M. Babu, Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature* **494**, 185–194 (2013).
194. F. Niroomand, R. A. Mura, L. Piacentini, W. Kübler, Opioid receptor agonists activate pertussis toxin-sensitive G proteins and inhibit adenylyl cyclase in canine cardiac sarcolemma, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **354**, 643–649 (1996).
195. J. E. Schultz, G. J. Gross, Opioids and cardioprotection, *Pharmacol. Ther.* **89**, 123–137 (2001).
196. J. Huh, G. J. Gross, H. Nagase, B. T. Liang, Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H377–383 (2001).
197. S. Pepe, Dysfunctional ischemic preconditioning mechanisms in aging, *Cardiovasc. Res.* **49**, 11–14 (2001).
198. T. M. Wong, J. Shan, Modulation of sympathetic actions on the heart by opioid receptor stimulation, *J. Biomed. Sci.* **8**, 299–306 (2001).
199. E. Braunwald,
200. H. Löwe, [Role of endogenous opioids in heart failure], *Z Kardiol* **80 Suppl 8**, 47–51 (1991).
201. F. Fontana, P. Bernardi, E. M. Pich, M. Capelli, L. Bortoluzzi, S. Spampinato, M. Canossa, Relationship between plasma atrial natriuretic factor and opioid peptide levels in healthy subjects and in patients with acute congestive heart failure, *Eur. Heart J.* **14**, 219–225 (1993).
202. N. Imai, M. Kashiki, P. D. Woolf, C. S. Liang, Comparison of cardiovascular effects of mu- and delta-opioid receptor antagonists in dogs with congestive heart failure, *Am. J. Physiol.* **267**, H912–917 (1994).
203. Y. Himura, C. S. Liang, N. Imai, J. M. Delehanty, P. D. Woolf, W. B. Hood, Short-term effects of naloxone on hemodynamics and baroreflex function in conscious dogs with pacing-induced congestive heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* **23**, 194–200 (1994).
204. F. Llobel, M. L. Laorden, Effects of mu-, delta- and kappa-opioid antagonists in atrial preparations from nonfailing and failing human hearts, *Gen. Pharmacol.* **28**, 371–374 (1997).
205. J. C. Schwartz, B. Malfroy, S. De La Baume, Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (“enkephalinase”) as neuropeptidase, *Life Sci.* **29**, 1715–1740 (1981).
206. S. C. Prajapati, R. Singh, S. S. Chauhan, Human dipeptidyl peptidase III regulates G-protein coupled receptor-dependent Ca²⁺ concentration in human embryonic kidney 293T cells, *Biol. Chem.* **397**, 563–569 (2016).
207. C. M. Lee, S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin, *J. Biol. Chem.* **257**, 12043–12050 (1982).
208. M. Abramić, M. Zubanović, L. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 29–38 (1988).

209. S. Ellis, J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.* **242**, 4623–4629 (1967).
210. G. R. Ordóñez, X. S. Puente, V. Quesada, C. López-Otín, Proteolytic systems: constructing degradomes, *Methods Mol. Biol.* **539**, 33–47 (2009).
211. G. Vazeux, J. Wang, P. Corvol, C. Llorens-Cortès, Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A, *J. Biol. Chem.* **271**, 9069–9074 (1996).
212. G. S. Cottrell, N. M. Hooper, A. J. Turner, Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme, *Biochemistry* **39**, 15121–15128 (2000).
213. K. Shibata, F. Kikkawa, Y. Suzuki, Y. Mizokami, H. Kajiyama, K. Ino, S. Nomura, T. Nagasaka, S. Mizutani, Expression of placental leucine aminopeptidase is associated with a poor outcome in endometrial endometrioid adenocarcinoma, *Oncology* **66**, 288–295 (2004).
214. W. T. Lowther, B. W. Matthews, Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings, *Chem. Rev.* **102**, 4581–4608 (2002).
215. D. B. Constam, A. R. Tobler, A. Rensing-Ehl, I. Kemler, L. B. Hersh, A. Fontana, Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization, *J. Biol. Chem.* **270**, 26931–26939 (1995).
216. P. Selvakumar, A. Lakshmikuttyamma, U. Das, H. N. Pati, J. R. Dimmock, R. K. Sharma, NC2213: a novel methionine aminopeptidase 2 inhibitor in human colon cancer HT29 cells, *Mol. Cancer* **8**, 65 (2009).
217. C. Söderberg, T. D. Giugni, J. A. Zaia, S. Larsson, J. M. Wahlberg, E. Möller, CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection, *J. Virol.* **67**, 6576–6585 (1993).
218. Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, H. Luesch, A genomic screen for activators of the antioxidant response element, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 5205–5210 (2007).
219. L. Vitale, M. Zubanović, M. Abramić, Properties and distribution of aminopeptidase and dipeptidyl aminopeptidase III of human erythrocytes, *Acta Biol. Med. Ger.* **40**, 1489–1495 (1981).
220. J. Hashimoto, Y. Yamamoto, H. Kurosawa, K. Nishimura, T. Hazato, Identification of dipeptidyl peptidase III in human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 393–397 (2000).
221. H. Sato, K. Kimura, Y. Yamamoto, T. Hazato, [Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain], *Masui* **52**, 257–263 (2003).
222. Y. Shimamori, Y. Watanabe, Y. Fujimoto, Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta, *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3333–3340 (1986).
223. N. C. Kar, C. M. Pearson, Dipeptidyl peptidases in human muscle disease, *Clinica Chimica Acta* **82**, 185–192 (1978).
224. V. K. Hopsu-Havu, C. T. Jansén, Peptidases in the skin. II. Demonstration and partial separation of several specific dipeptide naphthylamidases in the rat and human skin, *Arch Klin Exp Dermatol* **235**, 53–62 (1969).
225. A. A. Swanson, R. M. Davis, J. K. McDonald, Dipeptidyl peptidase III of human cataractous lenses. Partial purification, *Curr. Eye Res.* **3**, 287–291 (1984).

226. A. A. Swanson, R. M. Davis, B. Albers-Jackson, J. K. McDonald, Lens exopeptidases, *Exp. Eye Res.* **32**, 163–173 (1981).
227. I. Ohkubo, Y.-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.-G. Du, K. Nishi, Dipeptidyl Peptidase III from Rat Liver Cytosol: Purification, Molecular Cloning and Immunohistochemical Localization, *Biological Chemistry* **380** (1999), doi:10.1515/BC.1999.182.
228. F. Alba, J. C. Arenas, M. A. Lopez, Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents, *Peptides* **16**, 325–329 (1995).
229. K. R. Lynn, The isolation and some properties of dipeptidyl peptidases II and III from porcine spleen, *International Journal of Biochemistry* **23**, 47–50 (1991).
230. E. Melloni, F. Salamino, B. Sparatore, M. Michetti, A. Morelli, U. Benatti, A. De Flora, S. Pontremoli, Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging, *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 110–116 (1981).
231. M. Smyth, G. O’Cuinn, Dipeptidyl Aminopeptidase III of Guinea-Pig Brain: Specificity for Short Oligopeptide Sequences, *Journal of Neurochemistry* **63**, 1439–1445 (1994).
232. S. Dhanda, H. Singh, J. Singh, T. P. Singh, Isolation, purification and characterization of a DPP-III homologue from goat brain, *Protein Expression and Purification* **52**, 297–305 (2007).
233. T. Hazato, M. Shimamura, A. Ichimura, T. Katayama, Purification and Characterization of Two Distinct Dipeptidyl Aminopeptidases in Soluble Fraction from Monkey Brain and Their Action on Enkephalins, *The Journal of Biochemistry* **95**, 1265–1271 (1984).
234. N. R. Casewell, R. A. Harrison, W. Wüster, S. C. Wagstaff, Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: Echis) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts, *BMC Genomics* **10**, 564 (2009).
235. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, P. Auguste, J. Puiroux, Characterization of a functionally expressed dipeptidyl aminopeptidase III from *Drosophila melanogaster*, *Eur. J. Biochem.* **270**, 3074–3082 (2003).
236. C. Mazzocco, J. Puiroux, Purification of proctolin-binding proteins from the foregut of the insect *Blaberus craniifer*, *Eur. J. Biochem.* **267**, 2252–2259 (2000).
237. S. A. Chan, K. Toursarkissian, J. P. Sweeney, T. H. Jones, Dipeptidyl-aminopeptidases and aminopeptidases in *Dictyostelium discoideum*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 962–968 (1985).
238. Y. Watanabe, Y. Kumagai, Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 246–248 (1990).
239. L. Hola-Jamriska, J. P. Dalton, J. Aaskov, P. J. Brindley, Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes, *Parasitology* **118 (Pt 3)**, 275–282 (1999).
240. M. Tillack, L. Biller, H. Irmer, M. Freitas, M. A. Gomes, E. Tannich, I. Bruchhaus, The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes, *BMC Genomics* **8**, 170 (2007).
241. A. P. Lewis, P. J. Thomas, A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties, *Protein Sci.* **8**, 439–442 (1999).

242. G. Alvarez-Llamas, E. Szalowska, M. P. de Vries, D. Weening, K. Landman, A. Hoek, B. H. R. Wolffenbuttel, H. Roelofsen, R. J. Vonk, Characterization of the human visceral adipose tissue secretome, *Mol. Cell Proteomics* **6**, 589–600 (2007).
243. W. Chadwick, R. Brenneman, B. Martin, S. Maudsley, Complex and multidimensional lipid raft alterations in a murine model of Alzheimer's disease, *Int J Alzheimers Dis* **2010**, 604792 (2010).
244. J. A. Boutin, Myristoylation, *Cell. Signal.* **9**, 15–35 (1997).
245. P. Zlatkine, B. Mehul, A. I. Magee, Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif, *J. Cell. Sci.* **110 (Pt 5)**, 673–679 (1997).
246. J. Blenis, M. D. Resh, Subcellular localization specified by protein acylation and phosphorylation, *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 984–989 (1993).
247. K. Gevaert, A. Staes, J. Van Damme, S. De Groot, K. Hugelier, H. Demol, L. Martens, M. Goethals, J. Vandekerckhove, Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC, *Proteomics* **5**, 3589–3599 (2005).
248. T. Vanha-Perttula, Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties, *Clin. Chim. Acta* **177**, 179–195 (1988).
249. R. Wattiaux, S. Wattiaux-de Coninck, J. Thirion, M.-C. Gasingirwa, M. Jadot, Lysosomes and Fas-mediated liver cell death, *Biochem. J.* **403**, 89–95 (2007).
250. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, The First Structure of Dipeptidyl-peptidase III Provides Insight into the Catalytic Mechanism and Mode of Substrate Binding, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22316–22324 (2008).
251. Y. Shimamori, Y. Watanabe, Y. Fujimoto, Human placental dipeptidyl aminopeptidase III: hydrolysis of enkephalins and its stimulation by cobaltous ion, *Biochem. Med. Metab. Biol.* **40**, 305–310 (1988).
252. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, A.-A. Raymond, J. Puiroux, Purification, partial sequencing and characterization of an insect membrane dipeptidyl aminopeptidase that degrades the insect neuropeptide proctolin, *European Journal of Biochemistry* **268**, 4940–4949 (2001).
253. E. Dobrovetsky, A. Dong, A. Seitova, B. Duncan, L. Crombet, M. Sundstrom, C. Arrowsmith, A. Edwards, C. Bountra, A. Bochlarev, Crystal structure of human dipeptidyl peptidase III. Structural Genomics Consortium (SGC) (2009).
254. M. Barsun, N. Jajcanin, B. Vukelić, J. Spoljarić, M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins, *Biol. Chem.* **388**, 343–348 (2007).
255. S. Simaga, D. Babić, M. Osmak, M. Sprem, M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas, *Gynecol. Oncol.* **91**, 194–200 (2003).
256. M. Abramić, D. Schleuder, L. Dolovcak, W. Schröder, K. Strupat, D. Sagi, J. Peter-Katalini, L. Vitale, Human and rat dipeptidyl peptidase III: biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences, *Biol. Chem.* **381**, 1233–1243 (2000).
257. C. Mazzocco, J. Gillibert-Duplantier, V. Neaud, K. M. Fukasawa, S. Claverol, M. Bonneu, J. Puiroux, Identification and characterization of two dipeptidyl-peptidase III isoforms in *Drosophila melanogaster*, *The FEBS Journal* **273**, 1056–1064 (2006).

258. Y. D. Barac, F. Emrich, E. Krutzwald-Josefson, S. Schrepfer, L. C. Sampaio, J. T. Willerson, R. C. Robbins, A. Ciechanover, F.-W. Mohr, D. Aravot, D. A. Taylor, The ubiquitin-proteasome system: A potential therapeutic target for heart failure, *J. Heart Lung Transplant.* **36**, 708–714 (2017).
259. I. A. York, A. X. Y. Mo, K. Lemerise, W. Zeng, Y. Shen, C. R. Abraham, T. Saric, A. L. Goldberg, K. L. Rock, The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation, *Immunity* **18**, 429–440 (2003).
260. H. E. Moore, E. L. Davenport, E. M. Smith, S. Muralikrishnan, A. S. Dunlop, B. A. Walker, D. Krige, A. H. Drummond, L. Hooftman, G. J. Morgan, F. E. Davies, Aminopeptidase inhibition as a targeted treatment strategy in myeloma, *Mol. Cancer Ther.* **8**, 762–770 (2009).
261. A. A. Ferrando, A. M. Pendás, E. Llano, G. Velasco, R. Lidereau, C. López-Otín, Gene characterization, promoter analysis, and chromosomal localization of human bleomycin hydrolase, *J. Biol. Chem.* **272**, 33298–33304 (1997).
262. C. S. Dale, R. de L. Pagano, V. Rioli, Hemopressin: a novel bioactive peptide derived from the alpha-1-chain of hemoglobin, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100 Suppl 1**, 105–106 (2005).
263. F. M. Cunha, D. A. Berti, Z. S. Ferreira, C. F. Klitzke, R. P. Markus, E. S. Ferro, Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling, *J. Biol. Chem.* **283**, 24448–24459 (2008).
264. J. W. Wright, A. J. Bechtholt, S. L. Chambers, J. W. Harding, Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function, *Peptides* **17**, 1365–1371 (1996).
265. I. Moeller, S. Y. Chai, I. Smith, R. Lew, F. A. Mendelsohn, Haemorphin peptides may be endogenous ligands for brain angiotensin AT4 receptors, *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **25**, S68–71 (1998).
266. H. L. Rittner, A. Brack, C. Stein, Pain and the immune system, *Br J Anaesth* **101**, 40–44 (2008).
267. S. Mazumder, I. Nath, M. M. Dhar, Immunomodulation of human T cell responses with receptor selective enkephalins, *Immunol. Lett.* **35**, 33–38 (1993).
268. R. E. Faith, H. J. Liang, N. P. Plotnikoff, A. J. Murgo, N. F. Nimeh, Neuroimmunomodulation with enkephalins: in vitro enhancement of natural killer cell activity in peripheral blood lymphocytes from cancer patients, *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **6**, 88–98 (1987).
269. F. Fraioli, A. Fabbri, L. Gnassi, L. Silvestroni, C. Moretti, F. Redi, A. Isidori, Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **438**, 365–370 (1984).
270. D. Kew, K. E. Muffly, D. L. Kilpatrick, Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9143–9147 (1990).
271. L. E. Eiden, The enkephalin-containing cell: strategies for polypeptide synthesis and secretion throughout the neuroendocrine system, *Cell. Mol. Neurobiol.* **7**, 339–352 (1987).
272. M. M. Nieto, S. L. E. Guen, B. L. Kieffer, B. P. Roques, F. Noble, Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors, *Neuroscience* **135**, 305–313 (2005).
273. C. L. Williams, R. A. Jensen, Effects of vagotomy on Leu-enkephalin-induced changes in memory storage processes, *Physiol. Behav.* **54**, 659–663 (1993).

274. B. Dudás, I. Merchenthaler, Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 1842–1848 (2003).
275. N. Gilchrist, J. E. Bolton, R. A. Donald, J. H. Livesey, H. K. Roud, M. G. Nicholls, Hormonal effects and metabolic clearance rate of the enkephalin analogue DAMME in man, *Br J Clin Pharmacol* **16**, 465–469 (1983).
276. E. del Pozo, B. von Graffenried, J. Brownell, F. Derrer, P. Marbach, Endocrine effect of a methionine-enkephalin derivative (FK 33-824) in man, *Horm. Res.* **13**, 90–97 (1980).
277. D. Cocchi, A. Santagostino, I. Gil-Ad, S. Ferri, E. E. Müller, Leu-enkephalin-stimulated growth hormone and prolactin release in the rat: comparison with the effect of morphine, *Life Sci.* **20**, 2041–2045 (1977).
278. P. B. May, J. C. Mittler, N. H. Ertel, Enkephalins and pituitary hormone release: modification of responsiveness to LHRH, *Horm. Res.* **10**, 57–63 (1979).
279. J. Irazusta, A. Valdivia, D. Fernández, E. Agirregoitia, C. Ochoa, L. Casis, Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen, *J. Androl.* **25**, 733–739 (2004).
280. J. B. Nissen, K. Kragballe, Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes in vitro, *Exp. Dermatol.* **6**, 222–229 (1997).
281. J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin, J.-C. Do Rego, The endomorphin system and its evolving neurophysiological role, *Pharmacol. Rev.* **59**, 88–123 (2007).
282. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D. P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida, H. Ogita, Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension, *Hypertension* **68**, 630–641 (2016).
283. J. W. Kaspar, S. K. Niture, A. K. Jaiswal, Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 1304–1309 (2009).
284. S. K. Niture, J. W. Kaspar, J. Shen, A. K. Jaiswal, Nrf2 signaling and cell survival, *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**, 37–42 (2010).
285. L. A. Wilson, A. Gemin, R. Espiritu, G. Singh, ets-1 is transcriptionally up-regulated by H₂O₂ via an antioxidant response element, *FASEB J.* **19**, 2085–2087 (2005).
286. A. A. Shukla, M. Jain, S. S. Chauhan, Ets-1/ Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells, *The FEBS Journal* **277**, 1861–1875 (2010).
287. S. M. Hollenberg, C. J. Kavinsky, J. E. Parrillo, Cardiogenic shock, *Ann. Intern. Med.* **131**, 47–59 (1999).
288. H. R. Reynolds, J. S. Hochman, Cardiogenic shock: current concepts and improving outcomes, *Circulation* **117**, 686–697 (2008).
289. T. Tarvasmäki, M. Haapio, A. Mebazaa, A. Sionis, J. Silva-Cardoso, H. Tolppanen, M. G. Lindholm, K. Pulkki, J. Parissis, V.-P. Harjola, J. Lassus, CardShock Study Investigators, Acute kidney injury in cardiogenic shock: definitions, incidence, haemodynamic alterations, and mortality, *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 572–581 (2018).

290. S. Champion, Extracorporeal membrane oxygenation in the therapy of cardiogenic shock (ECMO-CS): the need for a better definition of refractory cardiogenic shock, *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 197–198 (2018).
291. J. S. Hochman, Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm, *Circulation* **107**, 2998–3002 (2003).
292. M. Schmidt, A. Burrell, L. Roberts, M. Bailey, J. Sheldrake, P. T. Rycus, C. Hodgson, C. Scheinkestel, D. J. Cooper, R. R. Thiagarajan, D. Brodie, V. Pellegrino, D. Pilcher, Predicting survival after ECMO for refractory cardiogenic shock: the survival after veno-arterial-ECMO (SAVE)-score, *Eur. Heart J.* **36**, 2246–2256 (2015).
293. G. Muller, E. Flecher, G. Lebreton, C.-E. Luyt, J.-L. Trouillet, N. Bréchet, M. Schmidt, C. Mastroianni, J. Chastre, P. Leprince, A. Anselmi, A. Combes, The ENCOURAGE mortality risk score and analysis of long-term outcomes after VA-ECMO for acute myocardial infarction with cardiogenic shock, *Intensive Care Med* **42**, 370–378 (2016).
294. W.-C. Chen, K.-Y. Huang, C.-W. Yao, C.-F. Wu, S.-J. Liang, C.-H. Li, C.-Y. Tu, H.-J. Chen, The modified SAVE score: predicting survival using urgent veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation within 24 hours of arrival at the emergency department, *Crit Care* **20**, 336 (2016).
295. V.-P. Harjola, J. Lassus, A. Sionis, L. Køber, T. Tarvasmäki, J. Spinar, J. Parissis, M. Banaszewski, J. Silva-Cardoso, V. Carubelli, S. Di Somma, H. Tolppanen, U. Zeymer, H. Thiele, M. S. Nieminen, A. Mebazaa, CardShock Study Investigators, GREAT network, Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock, *Eur. J. Heart Fail.* **17**, 501–509 (2015).
296. V.-P. Harjola, J. Parissis, H.-P. Brunner-La Rocca, J. Čelutkienė, O. Chioncel, S. P. Collins, D. De Backer, G. S. Filippatos, E. Gayat, L. Hill, M. Lainscak, J. Lassus, J. Masip, A. Mebazaa, Ö. Miró, A. Mortara, C. Mueller, W. Mullens, M. S. Nieminen, A. Rudiger, F. Ruschitzka, P. M. Seferovic, A. Sionis, A. Vieillard-Baron, J. M. Weinstein, R. A. de Boer, M. G. Crespo-Leiro, M. Piepoli, J. P. Riley, Comprehensive in-hospital monitoring in acute heart failure: applications for clinical practice and future directions for research. A statement from the Acute Heart Failure Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC), *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 1081–1099 (2018).
297. K. Takagi, A. Blet, B. Levy, B. Deniau, F. Azibani, E. Feliot, A. Bergmann, K. Santos, O. Hartmann, E. Gayat, A. Mebazaa, A. Kimmoun, Circulating dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial, *Eur. J. Heart Fail.* (2019), doi:10.1002/ejhf.1600.
298. J. Bakker, P. Gris, M. Coffernils, R. J. Kahn, J. L. Vincent, Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock, *Am. J. Surg.* **171**, 221–226 (1996).
299. P. Attaná, C. Lazzeri, M. Chiostrì, C. Picariello, G. F. Gensini, S. Valente, Lactate clearance in cardiogenic shock following ST elevation myocardial infarction: a pilot study, *Acute Card Care* **14**, 20–26 (2012).
300. Z. Zhang, X. Xu, Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis*, *Crit. Care Med.* **42**, 2118–2125 (2014).
301. L. Rehfeld, E. Funk, S. Jha, P. Macheroux, O. Melander, A. Bergman, Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples, *J. Appl. Lab. Med.* (2018).

302. B. Deniau, L. Rehfeld, K. Santos, A. Dienelt, F. Azibani, M. Sadoune, P. R. Kounde, J. L. Samuel, H. Tolpannen, J. Lassus, V.-P. Harjola, N. Vodovar, A. Bergmann, O. Hartmann, A. Mebazaa, A. Blet, Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics, *Eur. J. Heart Fail.* (2019), doi:10.1002/ejhf.1601.
303. S. Kohsaka, V. Menon, A. M. Lowe, M. Lange, V. Dzavik, L. A. Sleeper, J. S. Hochman, SHOCK Investigators, Systemic inflammatory response syndrome after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock, *Arch. Intern. Med.* **165**, 1643–1650 (2005).
304. A. Reyentovich, M. H. Barghash, J. S. Hochman, Management of refractory cardiogenic shock, *Nat Rev Cardiol* **13**, 481–492 (2016).
305. E. Bassi, M. Park, L. C. P. Azevedo, Therapeutic strategies for high-dose vasopressor-dependent shock, *Crit Care Res Pract* **2013**, 654708 (2013).
306. E. Braunwald, Heart Failure, *JACC: Heart Failure* **1**, 1–20 (2013).
307. E. Gutierrez, A. J. Flammer, L. O. Lerman, J. Elizaga, A. Lerman, F. Fernandez-Aviles, Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease, *European Heart Journal* **34**, 3175–3181 (2013).
308. C. W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt, J. Butler, D. E. Casey, M. H. Drazner, G. C. Fonarow, S. A. Geraci, T. Horwich, J. L. Januzzi, M. R. Johnson, E. K. Kasper, W. C. Levy, F. A. Masoudi, P. E. McBride, J. J. V. McMurray, J. E. Mitchell, P. N. Peterson, B. Riegel, F. Sam, L. W. Stevenson, W. H. W. Tang, E. J. Tsai, B. L. Wilkoff, 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure, *Journal of the American College of Cardiology* **62**, e147–e239 (2013).
309. H. Zhan, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo, K. Kani, Peptidases play an important role in cataractogenesis: an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats, *Histochem. J.* **33**, 511–521 (2001).
310. S. Bloom, D. L. Davis, Calcium as Mediator of Isoproterenol-Induced Myocardial Necrosis, *Am J Pathol* **69**, 459–470 (1972).
311. W. W. Brooks, C. H. Conrad, Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates, *Comp Med* **59**, 339–343 (2009).
312. S. Hasić, R. Jadrić, E. Kiseljaković, Z. Mornjaković, M. Winterhalter-Jadrić, Troponin T and histological characteristics of rat myocardial infarction induced by isoproterenol, *Bosn J Basic Med Sci* **7**, 212–217 (2007).
313. H. E. Cingolani, M. C. Villa-Abrille, M. Cornelli, A. Nolly, I. L. Ennis, C. Garciarena, A. M. Suburo, V. Torbidoni, M. V. Correa, M. C. Camiliónde Hurtado, E. A. Aiello, The Positive Inotropic Effect of Angiotensin II: Role of Endothelin-1 and Reactive Oxygen Species, *Hypertension* **47**, 727–734 (2006).
314. M. Kobayashi, Y. Furukawa, S. Chiba, Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart, *European Journal of Pharmacology* **50**, 17–25 (1978).
315. E. Antonucci, P. J. Gleeson, F. Annoni, S. Agosta, S. Orlando, F. S. Taccone, D. Velissaris, S. Scolletta, Angiotensin II in Refractory Septic Shock, *Shock* **47**, 560–566 (2017).
316. E. Feolde, P. Vigne, C. Frelin, Angiotensin AT1 receptors mediate a positive inotropic effect of angiotensin II in guinea pig atria, *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 63–66 (1993).

317. A. Meissner, J. Y. Min, R. Simon, Effects of angiotensin II on inotropy and intracellular Ca²⁺ handling in normal and hypertrophied rat myocardium, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2507–2518 (1998).
318. C. S. Moravec, M. D. Schluchter, L. Paranandi, B. Czerska, R. W. Stewart, E. Rosenkranz, M. Bond, Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro, *Circulation* **82**, 1973–1984 (1990).
319. M. G. Petroff, E. A. Aiello, J. Palomeque, M. A. Salas, A. Mattiazzi, Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium, *J. Physiol. (Lond.)* **529 Pt 1**, 189–203 (2000).
320. D. T. Andreis, M. Singer, Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum, *Intensive Care Med* **42**, 1387–1397 (2016).
321. C. Martin, S. Medam, F. Antonini, J. Alingrin, M. Haddam, E. Hammad, B. Meyssignac, C. Vigne, L. Zieleskiewicz, M. Leone, NOREPINEPHRINE: NOT TOO MUCH, TOO LONG, *Shock* **44**, 305–309 (2015).
322. J. R. Teerlink, J. M. Pfeffer, M. A. Pfeffer, Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats, *Circ. Res.* **75**, 105–113 (1994).
323. P. Allawadhi, A. Khurana, N. Sayed, P. Kumari, C. Godugu, Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant-based approaches for intervention, *Phytother Res* **32**, 1908–1932 (2018).
324. D. Grimm, D. Elsner, H. Schunkert, M. Pfeifer, D. Griese, G. Bruckschlegel, F. Muders, G. A. Riegger, E. P. Kromer, Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system, *Cardiovasc. Res.* **37**, 91–100 (1998).
325. A. P. Davel, P. C. Brum, L. V. Rossoni, Isoproterenol Induces Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction via a G_iα-Coupled β₂-Adrenoceptor Signaling Pathway, *PLoS One* **9** (2014), doi:10.1371/journal.pone.0091877.
326. S. Y. Surikow, T. H. Nguyen, I. Stafford, M. Chapman, S. Chacko, K. Singh, G. Licari, B. Raman, D. J. Kelly, Y. Zhang, M. T. Waddingham, D. T. Ngo, A. P. Bate, S. J. Chua, M. P. Frenneaux, J. D. Horowitz, Nitrosative Stress as a Modulator of Inflammatory Change in a Model of Takotsubo Syndrome, *JACC Basic Transl Sci* **3**, 213–226 (2018).
327. T. van der Poll, F. L. van de Veerdonk, B. P. Scicluna, M. G. Netea, The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets, *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 407–420 (2017).
328. L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, C. Libert, Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?, *Trends Microbiol.* **19**, 198–208 (2011).
329. R. J. Goris, W. K. Boekholtz, I. P. van Bebber, J. K. Nuytinck, P. H. Schillings, Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model, *Arch Surg* **121**, 897–901 (1986).
330. R. P. Fairman, F. L. Glauser, Pathophysiologic alterations in endotoxemia. Similarities to an animal model, *Arch. Intern. Med.* **140**, 788–790 (1980).
331. D. G. Remick, D. E. Newcomb, G. L. Bolgos, D. R. Call, Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture, *Shock* **13**, 110–116 (2000).
332. R. E. Fish, J. A. Spitzer, Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious, unrestrained rat: a unique model of chronic endotoxemia, *Circ. Shock* **12**, 135–149 (1984).

333. D. C. Lindsey, T. E. Emerson, T. E. Thompson, A. E. John, M. L. Duerr, C. M. Valdez, H. S. Kuo, R. B. Bouffard, R. G. Irwin, D. Canivel, Characterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction, *Circ. Shock* **34**, 298–310 (1991).
334. F. B. Taylor, Staging of the pathophysiologic responses of the primate microvasculature to *Escherichia coli* and endotoxin: examination of the elements of the compensated response and their links to the corresponding uncompensated lethal variants, *Crit. Care Med.* **29**, S78-89 (2001).
335. C. E. Lagoa, L. F. P. de Figueiredo, R. J. Cruz, E. Silva, M. Rocha e Silva, Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion, *Crit Care* **8**, R221-228 (2004).
336. A. del P. G. Garrido, R. J. Cruz, L. F. Poli de Figueiredo, M. Rocha e Silva, Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis, *Crit Care* **10**, R62 (2006).
337. D. J. Dehring, S. H. Crocker, B. L. Wismar, S. M. Steinberg, B. D. Lowery, C. T. Cloutier, Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure, *J. Surg. Res.* **34**, 151–158 (1983).
338. D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, P. A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat Protoc* **4**, 31–36 (2009).
339. L. F. Poli-de-Figueiredo, A. G. Garrido, N. Nakagawa, P. Sannomiya, Experimental models of sepsis and their clinical relevance, *Shock* **30 Suppl 1**, 53–59 (2008).
340. J. A. Buras, B. Holzmann, M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage, *Nat Rev Drug Discov* **4**, 854–865 (2005).
341. S. J. Beesley, G. Weber, T. Sarge, S. Nikravan, C. K. Grissom, M. J. Lanspa, S. Shahul, S. M. Brown, Septic Cardiomyopathy, *Crit. Care Med.* **46**, 625–634 (2018).

La voie de la dipeptidyl-peptidase 3 :

Une nouvelle voie thérapeutique de la défaillance cardiaque aiguë

Introduction

L'insuffisance cardiaque (IC) aiguë est une pathologie multifactorielle responsable du décès de plusieurs millions de personnes chaque année. Sa physiopathologie est complexe et non entièrement élucidée. De plus, les traitements actuels ne permettent pas d'éviter le décès des patients les plus graves. La dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) est une métalloprotéinase ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus biologiques, notamment dans la régulation de la pression artérielle (en clivant l'angiotensine 2). Les fonctions biologiques exactes de la DPP3 sont inconnues à ce jour. Les objectifs de ce travail étaient de déterminer les fonctions physiopathologiques de la DPP3 au cours de l'IC aiguë d'origine catécholaminergique et septique.

Méthodes

Deux modèles ont été utilisés dans ce travail : 1/ le modèle d'IC aiguë à l'isoprotérénol (ISO, 300 mg/kg/12h) chez des souris mâles C57Bl6j de 3 mois et 2/ le modèle d'IC aiguë septique chez des rats mâles Wistar de 3 mois par ligature et ponction caecale (LPC). Les paramètres cardiovasculaires (dans les deux modèles) et rénaux (dans le modèle ISO) ont été évalués par échographie. Nous avons exploré le stress oxydant myocardique par marquage DHE sur des coupes de cœur dans les deux modèles. Des dosages d'angiotensines *in vitro* en présence DPP3 ont été réalisés chez la souris (modèle ISO)

Résultats

L'injection de la protéine DPP3 chez la souris saine était responsable d'une dépression myocardique (baisse de $10 \pm 2\%$ de la fraction de raccourcissement) ainsi que d'une altération de l'hémodynamique rénale (augmentation de l'index de résistance rénale de 0.30 ± 0.02). De plus, l'adjonction de DPP3 avec le plasma de souris était associée à une baisse des taux de toutes les angiotensines. 1/ Dans le modèle d'IC aiguë à l'ISO, l'inhibition de la DPP3 par le Procizumab normalisait rapidement la fonction cardiaque ainsi que l'hémodynamique rénale avec une réduction marquée du stress oxydant et de l'inflammation myocardique. 2/ Dans le modèle de cardiomyopathie septique chez le rat, l'injection de Procizumab permettait de normaliser rapidement la fraction de raccourcissement et le débit cardiaque des animaux septiques. Une réduction du stress oxydant était observée dans le cœur des animaux traités. De plus, la mortalité des animaux septiques traités par le Procizumab était réduite.

Conclusion

La DPP3 est un facteur dépresseur myocardique impliqué dans le choc cardiogénique et dans la cardiomyopathie septique. L'inhibition des taux excessifs de DPP3 par le Procizumab, un anticorps spécifique de la DPP3, permettait d'améliorer la contraction myocardique, l'hémodynamique rénale et d'améliorer la survie des animaux. Cet anticorps se positionne comme une option thérapeutique intéressante dans les états de chocs cardiogéniques et septiques les plus graves. Cependant, les mécanismes d'action du Procizumab ne sont encore élucidés. Une modulation des taux circulants des acteurs du système rénine angiotensine aldostérone et notamment de l'angiotensine 2 est l'hypothèse retenue actuellement. Elle doit être confirmée par des études expérimentales et cliniques.