



**HAL**  
open science

# Comparaison des effets des vasopresseurs et immunothérapie du sepsis sur la croissance bactérienne : intérêt d'une alternative thérapeutique

Prabakar Vaittinada Ayar

## ► To cite this version:

Prabakar Vaittinada Ayar. Comparaison des effets des vasopresseurs et immunothérapie du sepsis sur la croissance bactérienne : intérêt d'une alternative thérapeutique. Biotechnologies. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7311 . tel-04097989

**HAL Id: tel-04097989**

**<https://theses.hal.science/tel-04097989>**

Submitted on 15 May 2023

**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

École doctorale n°561 Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

*Laboratoire Biomarqueurs et maladies cardiaques*

*UMR-S 942 " Cardiovascular MARKers in Stressed COnditions - MASCOT "*

# Comparaison des effets des vasopresseurs et immunothérapie du sepsis sur la croissance bactérienne : intérêt d'une alternative thérapeutique

Par Prabakar VAITTINADA AYAR

Thèse de doctorat de BIOTHÉRAPIES ET BIOTECHNOLOGIES

Dirigée par Alexandre Mebazaa et Alice Blet

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2021

Devant un jury composé de :

Sandrine Charpentier, PU-PH, Toulouse III Paul Sabatier, *Rapporteur*

Antoine Kimmoun, PU-PH, Université de Lorraine (Nancy), *Rapporteur*

Saïd Laribi, PU-PH, Université de Tours, *Examineur*

Enrique Casalino, PU-PH, Université de Paris, *Examineur*

Hervé Jacquier, MCU-PH, Université de Paris, *Examineur*

Clémence Massip, MCU-PH, Toulouse III Paul Sabatier, *Examinatrice*

Feriel Azibani, PhD, Université de Paris, *Membre invité*

## Université de Paris

École doctorale n°561 Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

*Laboratoire Biomarqueurs et maladies cardiaques*

*UMR-S 942 " Cardiovascular MARKers in Stressed COnditions - MASCOT "*

# Comparaison des effets des vasopresseurs et immunothérapie du sepsis sur la croissance bactérienne : intérêt d'une alternative thérapeutique

Par Prabakar VAITTINADA AYAR

Thèse de doctorat de BIOTHÉRAPIES ET BIOTECHNOLOGIES

Dirigée par Alexandre Mebazaa et Alice Blet

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2021

Devant un jury composé de :

Sandrine Charpentier, PU-PH, Toulouse III Paul Sabatier, *Rapporteur*

Antoine Kimmoun, PU-PH, Université de Lorraine (Nancy), *Rapporteur*

Saïd Laribi, PU-PH, Université de Tours, *Examineur*

Enrique Casalino, PU-PH, Université de Paris, *Examineur*

Hervé Jacquier, MCU-PH, Université de Paris, *Examineur*

Clémence Massip, MCU-PH, Toulouse III Paul Sabatier, *Examinatrice*

Feriel Azibani, PhD, Université de Paris, *Membre invité*

*“Impose ta chance, serre ton bonheur et va vers ton risque.  
A te regarder, ils s'habitueront.”*

**René Char**

*“La meilleure des positions c'est d'être sous-estimé.”*

**Quincy Jones**



## Remerciements

### **A Madame le Professeur Sandrine Charpentier**

Merci de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur. Merci pour vos remarques et votre bienveillance. Puisse ce travail vous témoigner toute ma reconnaissance.

### **A Monsieur le Professeur Antoine Kimmoun**

Merci de la faveur que vous m'accordez de juger ce travail en tant que rapporteur. Merci pour tous vos conseils. Puisse ce travail vous témoigner de mon entière gratitude.

### **A Monsieur le Professeur Saïd Laribi**

Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de juger ce travail, après m'avoir suivi pendant 3 ans. Puisse ce travail être à la hauteur de vos espérances et vous témoigner ma sincère reconnaissance.

### **A Madame le Docteur Clémence Massip**

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Puisse ce travail vous attester de mon entière gratitude.

### **A Monsieur le Professeur Enrique Casalino**

Merci de m'avoir permis d'aller vers d'autres horizons et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Je t'en suis reconnaissant.

**A Madame le Docteur Ferial Azibani**

Merci pour ton encadrement, ton aide constante, ta rigueur, ta bienveillance à mon égard, cela a été une bouffée d'oxygène pour moi. Puisse ce travail te témoigner ma reconnaissance.

**A Monsieur le Docteur Hervé Jacquier**

Merci pour ton encadrement, ton soutien, et d'avoir cru en notre projet jusqu'au bout. Je suis heureux de t'avoir rencontré sur le plan professionnel mais surtout humain. Puisse ce travail te témoigner ma reconnaissance.

**A Madame le Docteur Alice Blet**

Merci pour ton encadrement, de m'avoir mis le pied à l'étrier au sein de l'unité. Tes remarques pertinentes m'ont permis d'avancer jusqu'au bout. Puisse ce travail te témoigner ma reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Alexandre Mebazaa**

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce projet. Je tiens à vous remercier pour m'avoir fait confiance sans aucun *a priori*, et de m'avoir guidé de bout en bout. Puisse ce travail être le témoin de ma sincère gratitude.

**A Monsieur le Professeur Erick Denamur**

Merci pour votre accueil au sein de votre unité 1137 IAME à Bichat. Merci pour vos précieux conseils qui ont été une plus-value indéniable pour mon travail. Puisse ce travail vous témoigner toute ma reconnaissance.

**A toute l'unité INSERM U942**

Merci à tous pour votre soutien, vos remarques, votre aide et votre bienveillance.

## **A Neela et Maya**

Mes deux crapules, vous m'avez tout à tour ouvert les yeux sur les choses essentielles de la vie. Vous êtes et serez toujours mes plus belles réussites.

## **A Claire**

Tu me portes et me supportes depuis déjà 12 ans. Partager ma vie avec toi a été la meilleure décision de toute ma vie. Je nous vois très bien vieux et fripés dans plusieurs années à nous bouffer le nez pour une bêtise mais je sais que rien ne peut nous séparer. Merci de m'aimer comme je suis mon amour, j'ai de la chance.

## **A Maman**

Toi qui as fait de moi ce que je suis, je ne te remercierai jamais assez. Toi qui nous as donné tout ton amour et pourtant la vie n'ait pas été tendre avec toi. Toi qui m'as donné la force de caractère nécessaire en me disant de ne jamais m'apitoyer sur mon sort et d'essayer d'aider mon prochain. Je t'aime pour toujours et à jamais.

## **A Vinou**

Mon autre moi, mon alter ego, depuis l'enfance, nous nous sommes toujours soutenus, motivés et protégés. Tu as toujours su me dire les mots nécessaires pour me faire avancer. Tu m'as transmis ta confiance. Ta force m'a toujours été vitale et le sera toujours. Mon frère, sans toi je ne serais pas là.

## Table des matières

Remerciements .....	4
Liste des illustrations.....	10
Liste des tableaux.....	12
Abréviations .....	13
Résumé en français .....	15
Résumé en anglais.....	17
Introduction générale .....	19
1. Le sepsis.....	20
1.1. Définition .....	20
1.2. Epidémiologie .....	22
1.3. Dysfonction vasculaire du sepsis .....	23
1.4. Cardiomyopathie septique.....	25
2. Prise en charge actuelle du sepsis et choc septique.....	32
2.1. Réanimation initiale .....	32
2.2. Traitement étiologique : antimicrobien.....	33
2.3. Traitement symptomatique : hémodynamique .....	34
2.4. Autres effets des agents vasopresseurs et inotrope du sepsis connus.....	38
3. La dipeptidyl peptidases 3.....	45
3.1. Généralités.....	45
3.2. La dipeptidyl peptidase-3 (DPP3).....	46
3.3 Rôles physiopathologiques de DPP3.....	52
4. <i>Escherichia coli</i> : une bactérie modèle pour l'étude du sepsis .....	55
4.1 Caractéristiques microbiologiques et habitat.....	56
4.2 Diversité génétique de <i>E. coli</i> .....	58
4.3 Méthodes utilisées pour l'étude de la diversité génétique de <i>E. coli</i> .....	59
4.4. Groupes phylogénétiques, commensalisme et infections. ....	64
4.5. Pathovars .....	65
Objectifs généraux du travail .....	67
Partie 1 : Article 1 .....	69
Analysis of blood culture in a rat model of cecal ligation and puncture induced sepsis.....	69
1. Introduction.....	70
2. Publication dans Intensive care medicine experimental .....	72
3. Discussion.....	92

Partie 2 : Effet des vasopresseurs de la prise en charge symptomatique du sepsis sur la croissance bactérienne de <i>Escherichia coli</i> , bactérie modèle.....	95
1. Introduction.....	96
2. Matériel et méthode .....	98
2.1 Exploration <i>in Vitro</i> .....	98
2.2 Exploration <i>In vivo</i> de l'influence sur la croissance bactérienne de la noradrénaline.....	107
2.3 Analyse Statistique.....	109
3 Résultats.....	109
3.1 Evaluation des effets des thérapies vasopressives du sepsis sur la croissance microbienne <i>in vitro</i> .....	109
3.2 Evaluation des effets des thérapies du sepsis sur la croissance microbienne <i>in vivo</i>	132
4 Discussion & perspective du travail .....	134
Discussion et perspectives générale .....	139
1. Discussion générale.....	140
2. Perspectives générales.....	144
Bibliographie .....	150
Annexe 1 : Circulating dipeptidyl-peptidase 3 inhibition restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: a proof-of-concept study .....	174
Annexe 2 : "Biological sex-related influence on long-term outcome in patients with acute dyspnea at two Lithuanian emergency departments". .....	186

## Liste des illustrations

Figure 1. définition du sepsis-3 selon (3) .....	20
Figure 2. L'endothélium dans le sepsis d'après Ince et al (28) .....	25
Figure 3. Processus de la CMS (33) .....	29
Figure 4. Synthèse de la prise en charge du sepsis.....	33
Figure 5. La noradrénaline favorise la libération fer favorisant la synthèse de protéine bactérienne .....	40
Figure 6. Rôle de la noradrénaline dans la dysfonction immune du sepsis d'après (76) .....	43
Figure 7. Alignement des séquences d'acides aminés de DPPIII de diverses espèces (97) .....	47
Figure 8. DPP3 et renouvellement protéique cellulaire(97) .....	53
Figure 9. Rôles de la DPP3 au cours du stress oxydant cellulaire .....	54
Figure 10. Génomes bactériens : Core génome et pan génome (d'après(217)) .....	59
Figure 11. PCR quadriplex d'après Clermont et al. (242).....	60
Figure 12. Histoire phylogénétique d'Escherichia coli d'après (217).....	66
Figure 13. Etape de la croissance bactérienne.....	103
Figure 14. Calcul du taux de croissance maximal(312) .....	105
Figure 15. Protocole expérimental évaluant les effets de la noradrénaline, de l'angiotensine II, de la vasopressine et du PCZ sur la croissance bactérienne <i>in vivo</i> .....	107
Figure 16. Effet dose de la noradrénaline sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu riche .....	110
Figure 17. Effet de de la Noradrénaline sur la fitness de la collection NILS en milieu riche .	111
Figure 18. Effet dose de la noradrénaline sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu stressant...	112
Figure 19. Effet de de la Noradrénaline sur la fitness de la collection NILS en milieu stressant .....	113
Figure 20. Effet de de la Noradrénaline sur la fitness de la collection NILS en milieu urine .	114
Figure 21. Effet dose de l'angiotensine II sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu riche .....	116
Figure 22. Effet de l'angiotensine II sur la fitness de la collection NILS en milieu LB.....	117

Figure 23. Effet dose de l'angiotensine II sur la fitness de <i>E .coli</i> 536 en milieu stressant....	118
Figure 24. Effet de l'angiotensine II sur la fitness de la collection NILS en milieu stressant .	119
Figure 25. Courbe de croissance de de la collection NILS en présence d'Ang II sur 24h.....	120
Figure 26. Effet dose de la vasopressine sur la fitness de <i>E .coli</i> 536 en milieu LB.....	121
Figure 27. Effet de la Vasopressine sur la fitness de la collection NILS en milieu riche .....	122
Figure 28. Effet dose de vasopressine sur la fitness de <i>E .coli</i> 536 en milieu stressant .....	123
Figure 29. Effet de la Vasopressine sur la fitness de la collection NILS en milieu stressant..	124
Figure 30. Courbe de croissance de de la collection NILS en présence de vasopressine sur 24h .....	125
Figure 31. Effet dose du PCZ sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu riche.....	126
Figure 32. Effet dose du PCZ sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu riche dont l'effet à dose thérapeutique (0,42 mg/mL).....	127
Figure 33. Effet du PCZ sur la fitness de la collection NILS en milieu riche .....	128
Figure 34. Effet dose du PCZ sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu stressé .....	129
Figure 35. Effet dose du PCZ sur la fitness de <i>E. coli</i> 536 en milieu stressé dont l'effet à dose thérapeutique (0,42 mg/mL).....	129
Figure 36. Effet du PCZ sur la fitness de la collection NILS en milieu riche .....	130
Figure 37. Western blot sur culot bactérien 536 et Rat 4 en présence de ou non de vasopresseur .....	131
Figure 38. Evolution de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche de rats LPC traités avec de la noradrénaline.....	133
Figure 39. Phénomènes intriqués dans le sepsis impliqués dans la défaillance d'organe pouvant être aggravé par la noradrénaline .....	144
Figure 40. Nouveau protocole expérimental évaluant les effets de la noradrénaline, de l'angiotensine II, de la vasopressine et du PCZ sur la croissance bactérienne <i>in vivo</i> .....	146



## Liste des tableaux

Tableau 1. Définitions du sepsis d'après (1,3) .....	21
Tableau 2. SOFA score reproduit d'après (5) .....	22
Tableau 3. reproduit d'après (33) : Mesures de la cardiomyopathie induite par le sepsis .....	27
Tableau 4. Recommandation de la SCC pour le sepsis reproduit d'après(72).....	32
Tableau 5. Localisation, propriétés moléculaires et action des récepteurs à la vasopressine reproduit d'après (77) .....	35
Tableau 6. Dipeptidyl peptidases connus chez les mammifères reproduit d'après (97).....	46
Tableau 7. substrats connus de la DPP3 , tableau reproduit d'après (97).....	52
Tableau 8. Panel choisi de la collection NILS .....	99
Tableau 9. Vasopresseur du sepsis avec concentrations physiologiques, et thérapeutiques .....	101
Tableau 10. Synthèse des effets des différents vasopresseurs sur chacune des souches ....	132

## Abréviations

ACE	Enzyme De Conversion De L'angiotensine
ADM	Adrénomédulline
AMP	Adénosine Mono Phosphate
AT1	Récepteur De L'angiotensine 2 De Type 1
ATP	Adénosine Triphosphate
Ang II	Angiotensine II
BGN	Bacilles Gram Négatives
BGP	Bacilles Gram Positives
CLP	Caecal Ligation And Puncture
CMS	Cardiomyopathie Septique
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DHE	Dihydroethidium
DPP	Dipeptidyl Peptidase
EcDPP3	DPP3 De <i>E.Coli</i>
EM	Endomorphines
FDM	Facteur Dépresseur Myocardique
FEVG	Fraction D'éjection Du Ventricule Gauche
HO1	Heme Oxygenase 1
HMGB1	High Mobility Protein De Group 1
IC	Insuffisance Cardiaque
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 B
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
IP3	Inositol Triphosphate
ISO	Isoprotérénol 11
Keap1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LPC	Ligature Et Ponction Caecale
LPS	Lipopolysaccharide
MGR	Maximal growth rate
MDSC	Myeloid-Derived Suppressive Cells
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MLST	Multilocus sequence typing
NAD	Noradrénaline
NLR	NOD like receptors
NO	Monoxyde D'azote
NOS	Nitric Oxyde Synthase
NQO1	Nad(P)H Quinone Dehydrogenase 1
Nrf2	Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2)
PAMPs	<i>Pathogène</i> Associated Molecular Pattern
pAKT/AKT	PI3K-AKT Pathway
PCZ	Procizumab
PRRs	Pattern Recognition Receptor
RS	Réticulum Sarcoplasmique
SSC	Surviving sepsis campaign

SERCA2a	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> Atpase
SOFA	Sepsis-Related Organ Failure Assessment
SRAA	Système Rénine Angiotensine Aldostérone
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor A
TOP	Thimet Oligopeptidase
TPP	Tripeptidyl Peptidase
UFC	Unités Formant Colonie
VASO	Vasopressine

## Résumé en français

### Introduction

Le sepsis est une défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse inappropriée de l'hôte vis-à-vis d'une infection.

La prise en charge symptomatique de la défaillance vasculaire repose sur le remplissage vasculaire et l'utilisation des vasopresseurs, principalement la noradrénaline (NAD), qui peut présenter des effets délétères. Il est proposé des alternatives comme la vasopressine (VASO) ou l'angiotensine II (AngII) et des nouvelles thérapeutiques adjuvantes comme le Procizumab® (PCZ), un anticorps bloquant l'activité de la dipeptyl peptidase 3 (DPP3) un facteur dépresseur myocardique. Le PCZ améliore la défaillance cardio-vasculaire du sepsis dans un modèle murin de péritonite.

Sur le plan microbiologique, la compréhension expérimentale des aspects de résistance aux antibiotiques et de virulence apparaît comme centrale. Peu d'études se sont intéressées à l'impact des vasopresseurs sur la croissance bactérienne. *Escherichia coli* est une des causes les plus fréquentes du sepsis. Très étudiée, elle montre une forte diversité génétique entre les souches associées au microbiote intestinal et aux infections.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier l'écologie bactérienne dans un modèle murin de péritonite et de comparer l'effet de la NAD, l'AngII, la VASO et du PCZ sur la croissance bactérienne d'*E. coli* dans des milieux mimant différents compartiments de l'organisme.

### Méthodes

Après une revue de la littérature recherchant les bactéries impliquées dans les ligatures ponction caecale (LPC) chez la souris et le rat entre 2018 et 2019, les bactéries de notre modèle de sepsis par LPC chez le rat ont été identifiées par hémoculture.

Une collection de 21 souches d'*E. coli* représentative de l'espèce (NILS) était utilisée. Les milieux utilisés étaient un milieu riche en nutriment (lysogeny broth (LB)), un milieu stressant mimant le milieu vasculaire (sérum-SAPI) et des urines synthétiques. Les vasopresseurs étaient la NAD, l'AngII, la VASO et l'immunothérapie par le PCZ. Les effets-doses incluant des concentrations thérapeutiques ont été étudiés. Les courbes de croissance ont été réalisées par un lecteur de densité optique (Tecan®). Pour juger de la différence de la fitness bactérienne en présence ou en l'absence du traitement, la valeur sélective choisie comme critère de jugement principale était le taux de croissance maximal (MGR ( $p < 0.05$ )).

### Résultats

Selon notre revue de la littérature, 15% des auteurs instauraient une antibiothérapie empirique par céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération ou un carbapénème sans documentation bactérienne. Dans notre modèle de LPC, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* et *Enterobacter cloacae* ont été retrouvés.

L'étude de la croissance bactérienne *in vitro* a montré une réduction du MGR en LB ( $p < 0,05$ ) jusqu'à des concentrations physiologiques ( $10^{-9}$  M) et une augmentation du MGR en sérum-SAPI ( $p < 0,05$ ) en présence de NAD à concentration thérapeutique ( $10^{-6}$ ), indépendamment du groupe phylogénétique. Les mêmes résultats ont été observés en milieu urine pour la NAD. A contrario, pour AngII, aucune différence n'était observée. A contrario, pour AngII, aucune différence n'était observée. Pour VASO un effet dose était observé à 10x avec un MGR augmenté en sérum-SAPI et diminué en LB ( $p < 0.05$ ).

Concernant le PCZ, en milieu riche, le MGR de toutes les souches bactériennes était augmenté quelle que soit la concentration utilisée ( $p < 0.05$ ). En milieu stressant, le MGR ne semblait pas être affectés avec le PCZ.

### **Conclusion**

Contrairement à la NAD et au PCZ, la VASO et l'AngII à des concentrations thérapeutiques n'ont pas d'effets sur la croissance bactérienne de *E. coli*. Ces résultats doivent être confirmés dans un modèle animal et les mécanismes physiopathologiques explorés.

## Résumé en anglais

### Introduction

Sepsis is a life-threatening organ failure induced by an inappropriate host response to infection.

Symptomatic management of vascular dysfunction relies on fluid resuscitation and the use of vasopressors, mainly norepinephrin (NE), which may have deleterious effect.

Alternatives are proposed such as vasopressin (VASO), angiotensin II (AngII) and a new adjuvant therapy Procizumab® (PCZ), an antibody blocking the activity of dipeptyl peptidase 3 (DPP3), a myocardial depressant factor. PCZ improves sepsis-induced cardiovascular dysfunction in a murin model of peritonitis.

On the microbiological level, experimental understanding of antibiotic resistance and virulence aspects appears to be central. Few studies have focused on the impact of vasopressors on bacterial growth. *Escherichia coli* is one of the most frequent causes of sepsis. It is well studied and shows a high genetic diversity associated with the intestinal microbiota and infections.

The objectives of this work were to study the bacterial ecology in a murin model of peritonitis and to compare the effect of NE, AngII, VASO and PCZ on the bacterial growth of *E. coli* in media mimicking different compartments of the body.

### Methods

After a literature review of bacterial etiologies of mouse and rat CLP between 2018 and 2019, bacteria strains were identified by blood culture in a sepsis model of cecal ligation puncture (CLP) in rats.

A representative *E. coli* species collection of 21 strains (NILS) was used. Media used were a nutrient-rich medium (lysogeny broth (LB)), a stressful mimicking vascular medium (serum-SAPI) and synthetic urine. The vasopressors were NE, Ang II, VASO and PCZ. Dose effects and therapeutic concentrations were studied. Growth curves were performed by an optical density reader (Tecan®). The difference between the maximum growth rate (MGR) with and without treatment was the endpoint for assessing bacterial fitness ( $p < 0.05$ ).

### Results

According to our literature review, 15% of authors initiated empirical antibiotic therapy with 3rd generation cephalosporin or carbapenem without bacterial documentation. In our LPC model, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter cloacae* were found.

The study of bacterial growth in vitro showed a reduction of MGR in LB ( $p < 0.05$ ) down to physiological concentrations ( $10^{-9}$  M) and an increase of MGR in serum-SAPI ( $p < 0.05$ ) and in urine medium ( $p < 0.05$ ) in the presence of NE up to therapeutic concentration ( $10^{-6}$  M), regardless of phylogenetic group. In contrast, for AngII and VASO, no difference was observed except a dose effect (10x) for VASO with an increased MGR in serum-SAPI and decreased in LB ( $p < 0.05$ ).

For PCZ, in rich media, the MGR of all bacterial strains was increased regardless of the concentration used. In a stressful environment, the MGR wasn't affected.

### **Conclusion**

Unlike NE and PCZ, therapeutic concentrations of VASO and AngII have no effect on bacterial growth of *E. coli*. These results need to be confirmed in an animal model and the pathophysiological mechanisms to be explored.

## Introduction générale



# Introduction générale

## 1. Le sepsis

### 1.1. Définition

Le sepsis cause des millions de décès dans le monde. C'est un syndrome fréquent et grave connu depuis longtemps mais défini pour la première fois en 1991 (1–3).

Une infection est causée par un agent pathogène (bactérien, mycélien, parasitaire ou virale) engendrant des anomalies physiopathologiques liées au sepsis (3)(figure1). Initialement le sepsis avait été défini en se basant sur un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) (4) (tableau 1). En 2016, la troisième définition Sepsis-3 a révisé le sepsis comme « une défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse dérégulée de l'hôte à infection » (3) (tableau 1).

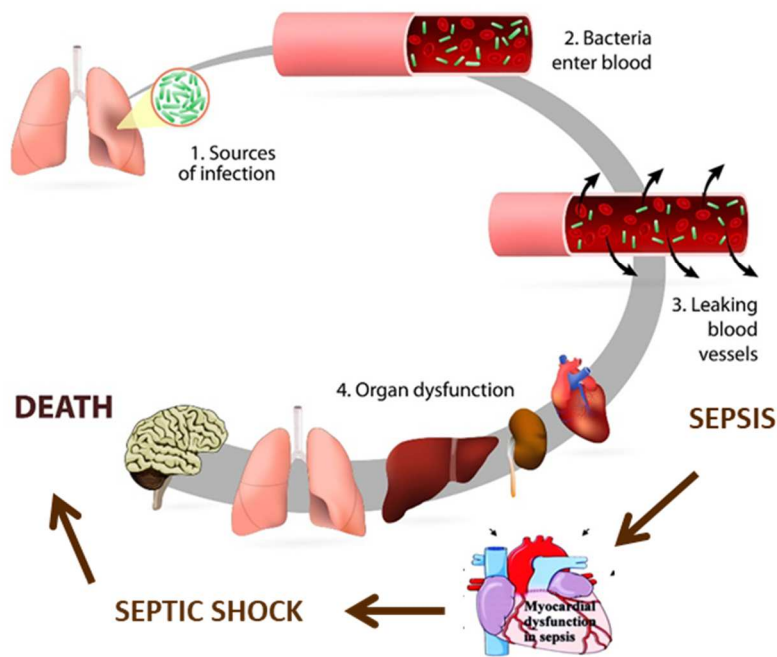


FIGURE 1. DEFINITION DU SEPSIS-3 SELON (3)

**TABLEAU 1. DEFINITIONS DU SEPSIS D'APRES (1,3)**

<b>Définition 1991 (1)</b>	
	2 critères parmi
<b>SIRS</b>	Température < 36 °C ou > 38°C
	Fréquence cardiaque > à 90/min
	Fréquence respiratoire > à 20/min ou PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg
	Leucocytes >12000/mm <sup>3</sup> ou <4000/mm <sup>3</sup>
<b>Sepsis</b>	SIRS + infection documentée
<b>Sepsis sévère</b>	Sepsis + défaillance d'organe
<b>Choc septique</b>	Défaillance d'organe persistant malgré un remplissage vasculaire adéquat
<b>Définition 2016 (Sepsis-3) (3)</b>	
<b>Sepsis</b>	Défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse inappropriée de l'hôte vis-à-vis d'une infection
<b>Choc septique</b>	Sepsis avec une hypotension persistante nécessitant des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne $\geq$ 65 mmHg et un taux de lactate sérique >2 mmol/L (18mg/dL) malgré un remplissage vasculaire adéquat.

Sur le plan pratique le sepsis se définit par une augmentation du SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment (tableau 2)) d'au moins 2 points lors d'un processus infectieux(5). Le SOFA basal est supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aiguë ou chronique, préexistante.

Tableau 2. SOFA score reproduit d'après (5)

Système	SCORE				
	0	1	2	3	4
Respiration PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200 avec soutien ventilatoire	< 100 avec soutien ventilatoire
Coagulation Plaquette , x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie Bilirubine, μmol/L	20	20-32	33-101	102-204	>204
Cardiovasculaire	PAM ≥ 70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamine < 5 ou dobutamine *	Dopamine 5, 1- 15 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradrénaline ≤ 0,1*	Dopamine > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradrénaline > 0,1*
Système nerveux central Glasgow coma scale	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rénal Creatinine, μmol/L	< 110	110-170	171-299	300-400	>440

Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score; PaO<sub>2</sub> : pression partielle d'oxygène ; FiO<sub>2</sub> : fraction inspirée d'oxygène ; PAM : pression artérielle moyenne.

\* les doses de catécholamines sont données en μg/kg/min.

## 1.2. Epidémiologie

A ce jour, on ne connaît pas l'incidence précise du sepsis (6). Dans le monde, 48,9 millions (intervalle d'incertitude (IU) à 95 % 38,9-62,9) de cas de sepsis ont été estimés en 2017 avec 11 millions (10,1-12,0) de morts, soit 19,7% (18,2-21,4) de l'ensemble des décès dans le monde en lien avec le sepsis. La prévalence du sepsis a diminué de 37% (95% IU 11,8-54,5) et

la mortalité a diminué de 52,8% (47,7-57,5) entre 1990 et 2017 (7). Les principales sources statistiques décrivant le sepsis sont issues des données des pays aisés, le nombre de décès annuels étant estimé à 3 millions (8). En 2001, aux Etats Unis, 750000 cas de sepsis sévères étaient dénombrés (9). Entre 2005 et 2010, la différence d'admission en soins intensifs entre l'Angleterre et les Etats Unis était de 15% avec respectivement 27 et 12 % d'admissions (10,11). Ce syndrome déjà sous-estimé et touchant une population de plus en plus âgée va poursuivre son accroissement (6). Troisième cause de mortalité outre atlantique en 2014(12), le taux de mortalité varie, selon les observations, de 20 à 50% (3,6,9,13). L'incidence et la mortalité liées au sepsis variaient considérablement d'une région à l'autre, le fardeau le plus élevé étant observé en Afrique subsaharienne, Océanie, Asie du Sud, Asie du Sud-Est (7). Malgré l'amélioration des techniques de soins intensifs et la réduction d'un cas de décès sur deux lié au sepsis en 30 ans (9,14), à ce jour, en cas de sepsis, la mortalité s'élève de 20 à 30%. Les étiologies les plus fréquentes sont par ordre de fréquence, la pneumonie (> 50%), puis les infections intra-abdominale et urinaire (9).

### 1.3. Dysfonction vasculaire du sepsis

#### *1.3.1 Sepsis & système rénine angiotensine aldostérone*

Dans le sepsis le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) est primordial pour préserver la vasomotricité (15–19). Afin de maintenir une perfusion d'organes le SRAA va être stimulé par la défaillance vasculaire puis circulatoire induite par le sepsis simultanément au système hypothalamo-hypophysaire, aux surrénales et au système nerveux sympathique (17,18,20–22).

Le monoxyde de carbone (NO), formé en abondance lors du sepsis, est une des causes essentielles de la vasoplégie. Cette dysfonction circulatoire septique, liée au NO, est la réponse aux cytokines pro- inflammatoires libérées lors du sepsis qui vont stimuler la NO

synthase produisant ainsi le NO (23). Cette vasoplégie septique n'est pas uniquement engendrée par le mécanisme du NO (24). Malgré des taux circulants et tissulaires élevés d'angiotensine II (AngII) pendant le sepsis (16,25), une dysfonction du SRAA est évoquée (26). Mais l'inhibition de ses récepteurs induites par les cytokines et le NO réduit les effets biologiques de l'AngII (16,17,25). Il a été récemment montré que le traitement des chocs vasoplégiques réfractaires par Ang II, chez le patient avec un haut taux de rénine, améliorait la survie (27). Ce haut taux de rénine implique une dysfonction du SRAA lors du choc vasoplégique d'origine septique.

### *1.3.2 Sepsis & dysfonction endothéliale*

Pendant le sepsis, le tonus et l'intégrité vasculaires sont compromis, ces deux facteurs contribuant au développement du choc. Le dysfonctionnement endothélial est l'une des principales caractéristiques du sepsis (28). Une réponse inflammatoire profonde entraîne une perturbation et la mort des cellules endothéliales (2,29). La perte de l'intégrité de la barrière endothéliale entraîne une extravasation de liquides et de molécules, provoquant un œdème et une perte de volume intravasculaire. Il en découle une réduction de la pression artérielle contribuant à la dysfonction d'organes (2,13,28).

L'Ang II, après activation des récepteurs de l'angiotensine 2 de type 1 (AT1), participe à la fuite microvasculaire en augmentant leur perméabilité par la modulation des niveaux d'ions calcium intracellulaires endothéliaux (30).

Les molécules d'adhésion sont mises à nu par la détérioration du glycocalyx infligée par le sepsis. Par ailleurs, la destruction du glycocalyx entraîne la transmigration des leucocytes et de facteurs pro-coagulants, entraînant la formation d'un thrombus (31). La destruction directe de la barrière endothéliale, induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote

species (RNS), compromet sa fonction. De plus, la déstabilisation de jonctions serrées, qui ancrent les cellules endothéliales, participe aussi à cette dysfonction endothéliale. Par la perte de la faculté du système mécanotransducteur, de la surexpression de NO et l'altération de la jonction cellulaire, la fonction de la cellule endothéliale contrôlant le tonus vasomoteur est perdue. Enfin, la destruction endothéliale libère dans la circulation des facteurs ayant des effets délétères sur le fonctionnement des cellules endothéliales (28) (figure 2).

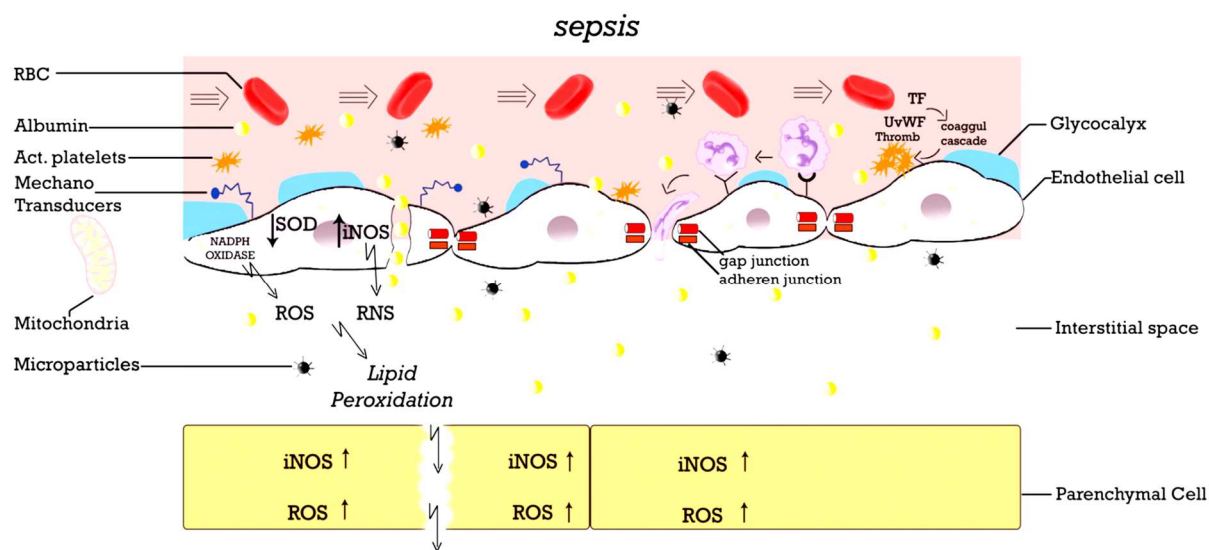


Figure 2. L'endothélium dans le sepsis d'après Ince et al (28)

#### 1.4. Cardiomyopathie septique

##### 1.4.1 Généralités

Lors du sepsis, la cardiomyopathie septique (CMS) est souvent décrite lorsqu'il existe des dysfonctions cardiaques (32,33). Décrite 40 ans auparavant, la CMS est très difficile à diagnostiquer devant la complexité du système cardiovasculaire et ses différentes présentations cliniques (34,35). Les critères échographiques de la CMS sont décrits dans le tableau 3. Cependant, l'absence de consensus sur les anomalies spécifiques lors du sepsis rend le diagnostic difficile. La prévalence de la CMS oscille entre 10 % et 70 % (36), cette complication entraîne 2 à 3 fois plus de décès (37,38).

La définition de la CMS correspond à une fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) inférieur à 45% (36) ; peu d'entre elles ont stratifié le degré de dysfonctionnement du ventricule gauche (VG) en classes légères, modérées ou sévères. L'utilisation de l'imagerie de la déformation du ventricule gauche est une mesure plus sensible que l'utilisation de la FEVG, mais l'importance clinique des perturbations légères est moins certaine, et la variabilité inter-opérateur peut être élevée (39).

Tableau 3. reproduit d'après (33) : Mesures de la cardiomyopathie induite par le sepsis

Paramètres	Seuils	Avantages	Inconvénients
<b>FEVG</b>	FEVG <40-45 % dans la plupart des études, bien que beaucoup comparent des moyennes sans spécifier un seuil	Peut être mesuré par échocardiographie (bien que plus précis avec l'IRM cardiaque) ; simple et familier pour les cliniciens	Dépendant des conditions pré et post charge, non associée avec réduction de la perfusion tissulaire ; l'échocardiographie peut être techniquement limitée ; la quantification par « à vus d'œil » est notoirement variable.
<b>Strain globale du VG</b>	Déformation longitudinale globale moins négative que -18% à -20% est généralement considéré comme anormale	Beaucoup moins dépendante des conditions de charge que la FEVG ; plus sensible que la FEVG pour le dysfonctionnement du ventricule gauche	Peut-être techniquement difficile à obtenir un signal fiable ; différents logiciels ont des seuils différents pour les valeurs anormales ; non associée avec réduction de la perfusion tissulaire
<b>Fraction de raccourcissement en surface du VD</b>	En général, une surface fractionnée de <35% est considéré comme anormal	Simple	Dépend fortement des conditions de conditions de pré et post charge et de l'état pulmonaire ; très difficile à mesurer avec précision en raison de la complexité de la géométrie du VD
<b>TAPSE</b>	<17 mm	Facile à acquérir par échocardiographie	Ne mesure que le mouvement longitudinal du VR ; affecté par la régurgitation tricuspide ; peut être affecté par la fonction du VG
<b>Performance diastolique VG</b>	$e' < 7$ cm/s septal et/ou <10 cm/s latéral ; $E/e' > 14$	Facile à acquérir par échocardiographie	$e'$ n'est pas fiable en cas d'anomalies régionales du de paroi, un bloc de branche ou une bloc ou calcification annulaire mitrale ; hétérogénéité avec l'âge
<b>Performance cardiaque relatif à la post-charge</b>	<40 %, <60 % ou <80 % de la normale attendue	Indépendant de la charge	Nécessite une mesure précise du débit cardiaque
<b>Couplage ventriculo-artériel</b>	Rapport entre l'élastance efficace artérielle sur l'élastance télésystolique systolique >1	Interroge sur la relation entre performance cardiaque et vasculaire	Très difficile à mesurer par échocardiographie ; n'est pas un paramètre cliniquement paramètre intuitif
<b>La troponine plasmatique I ou de la troponine T</b>	Dépend du test, mais généralement >99 <sup>ème</sup> percentile de la normale	Facilement mesurable ; sensible	Affecté par les comorbidités, en particulier la fonction rénale ; manque de spécificité
<b>Taux plasmatique de BNP ou taux de NT- proBNP</b>	Dépendant du test	Facilement mesuré ; libéré en réponse à au stress de la paroi du ventricule gauche et du ventricule droit	Affecté par les comorbidités, notamment la fonction rénale et l'obésité ; seuils dépendants de l'âge

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; NT- proBNP, N- terminal pro- B- type natriuretic peptide VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche, TAPSE : excursion systolique de l'anneau tricuspide



### 1.4.2 Physiopathologie de la CMS

La réponse immunitaire innée de l'hôte est activée en réponse à l'invasion d'un pathogène, ainsi débute la cascade physiopathologique du sepsis (40). Des médiateurs pro et anti-inflammatoires, pouvant être bénéfiques ou délétères chez l'hôte, sont libérés après la phase d'activation du système immunitaire (32,33). Conséquence d'un bas débit lors du choc septique, la CMS était dans un premier temps considérée comme une ischémie myocardique globale par réduction du flux coronaire (41). Au contraire, le flux coronaire était maintenue voir plus important (42).

Une lésion de type inflammatoire avec œdème tissulaire a été retrouvée par IRM (imagerie par résonance magnétique) cardiaque (43) et confirmait le maintien du flux coronaire (44). Une autre explication est l'effet pléiotrope des facteurs pro-inflammatoires produits durant le sepsis (38,45). Ces médiateurs vont altérer l'endothélium, augmenter l'infiltration interstitielle ainsi que les dépôts de fibrine et activer l'hémostase(46). Dans les cardiomyocytes, une dysfonction mitochondriale va libérer des ROS, par réaction des molécules d'oxygène avec des électrons libres et la dysfonction du métabolisme du calcium est induite par la majoration du stress oxydant (47). Les processus coupables d'œdème du tissu myocardique semblent faire partie des mécanismes physiopathologiques prédominant (48). Enfin une résistance secondaire aux catécholamines peut apparaître suite à une réduction des récepteurs adrénergiques(49). Les mécanismes de développement de la CMS sont résumés dans la figure 3.

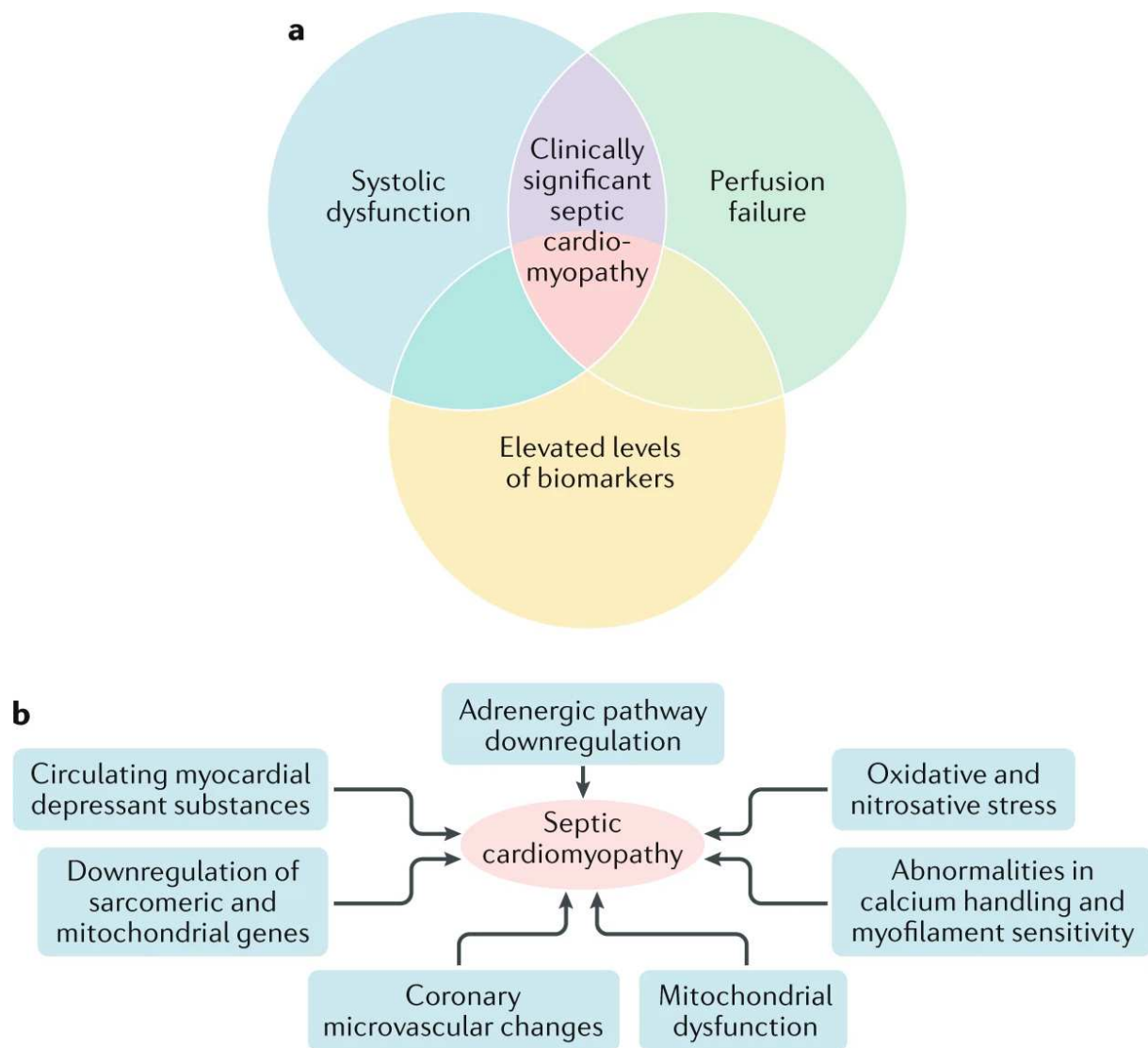


Figure 3. Processus de la CMS (33)

a. | zones de chevauchement entre les caractéristiques physiologiques, cliniques et biochimiques de la cardiomyopathie septique.

b. | Diverses voies métabolique potentiellement impliquées dans la cardiomyopathie induite par le sepsis

Dans les années 80, une molécule dans le sérum de patient septique engendrait chez le rat une réduction de la fraction de raccourcissement (50). Administrée ensuite chez l'homme cette substance provoque une dépression myocardique et est appelée facteur dépresseur myocardique (FDM)(23,51,52) .

Les cytokines sont les premières FDM mises en évidence (53). Des taux très élevés de cytokines (TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et IL-1 $\beta$  (l'interleukine-1 $\beta$ ) pendant les 2 premiers jours du

sepsis correspondaient à l'apparition de dysfonctions d'organes (53,54). Mais malgré la normalisation de ces cytokines après les 2 premiers jours, la défaillance cardiaque persistait, ce qui impliquaient d'autres éléments à l'origine de la dépression myocardique (50,54,55). La multitude de FDM et leurs mécanismes d'action ne sont pas bien connus, ni compris, avec parfois des effets contradictoires observés. (50,53,56–58).

Pendant l'infection, les bactéries sont dégradées en plusieurs éléments, appelés h (pathogène associated molecular pattern). Les macrophages ou les cellules dendritiques, cellules du système immunitaire inné sont responsables de cette dégradation. Les PAMPs sont des composants fonctionnels essentiels des micro-organismes des infections qui permettent à la cellule hôte ciblée de distinguer le "soi" du "non-soi" et favorisent les signaux associés à l'immunité innée (59). Les principaux PAMPs sont les acides nucléiques microbiens, y compris l'ADN, l'ARN double brin, l'ARN simple brin l'ARN 5'-triphosphate, ainsi que les lipoprotéines, les glycoprotéines de surface et les composants membranaires (les peptidoglycanes, l'acide lipoteichoïque, le lipopolysaccharide (LPS) et glycosylphosphatidylinositol).

Des DAMPs (damage associated molecular patterns) sont libérés lors de lésions cellulaires, parmi eux :

- l'héparane sulfate : élément de la membrane cellulaire (60) ;
- les histones circulants : il a été montré qu'un taux élevé de cette protéine chez les rats et les patients septiques était corélée au pronostic. (61) ;
- La HMGB1 (high mobility protein de group 1), protéine inducteur de la CMS, libérée par les cardiomyocytes (62,63).

Les TLR (toll like receptor) reconnaissent les PAMPs et DAMPs parmi un large panel de récepteurs innés, (64–66), appelés pattern recognition receptor (PRRs). Diverses cellules immunitaires ou non expriment ces récepteurs à leur surface, comme les cardiomyocytes (TLR

2 & 4). L'activation des PRRs engendre l'orage cytokinique, avec formation massive de cytokine pro-inflammatoire.

Parmi les différents facteurs jouant un rôle dans la cardiomyopathie septique, les DAMPs semblent influencer dans la dysfonction mitochondriale (67). Dans les cellules musculaires cardiaques, il se passe de nombreuses modifications des mitochondrie au cours du sepsis (modification architecturale, dommage de l'acide désoxyribonucléique (ADN), augmentation de perméabilité et de l'activité du cytochrome C oxydase) (68–70). L'importance des modifications est corrélée à la mortalité pendant le choc septique (71).

## 2. Prise en charge actuelle du sepsis et choc septique.

### 2.1. Réanimation initiale

Le « sepsis bundle » a été à l'origine de l'initiative de la " Surviving Sepsis Campaign" (SSC) depuis la première publication en 2004. Développés séparément des lignes directrices publiées par la SSC, les " bundles " (Tableau 4) sont utilisés pour l'amélioration de la qualité de la prise en charge du sepsis. La mise à jour de 2018 (72) reprend les éléments importants dans la prise en charge du sepsis et du choc septique (figure 4).

Tableau 4. Recommandation de la SCC pour le sepsis reproduit d'après(72)

Elément de du « bundle »	Grade de recommandation et niveau de preuve
Mesurer le taux de lactate. Re-mesurer si le lactate initial est > 2 mmol/L.	Recommandation faible, preuves de faible qualité.
Obtenir des hémocultures avant l'administration d'antibiotiques	Recommandation de bonne pratique
Administrer des antibiotiques à large spectre	Recommandation forte, qualité de preuve modérée
Administrer rapidement 30 ml/kg de cristalloïde en cas d'hypotension ou de lactate $\geq$ 4 mmol/L	Forte recommandation, faible qualité de preuves
Appliquer des vasopresseurs si le patient est hypotendu pendant ou après le remplissage vasculaire pour maintenir une PAM $\geq$ 65 mm Hg	Forte recommandation, qualité de preuve modérée.

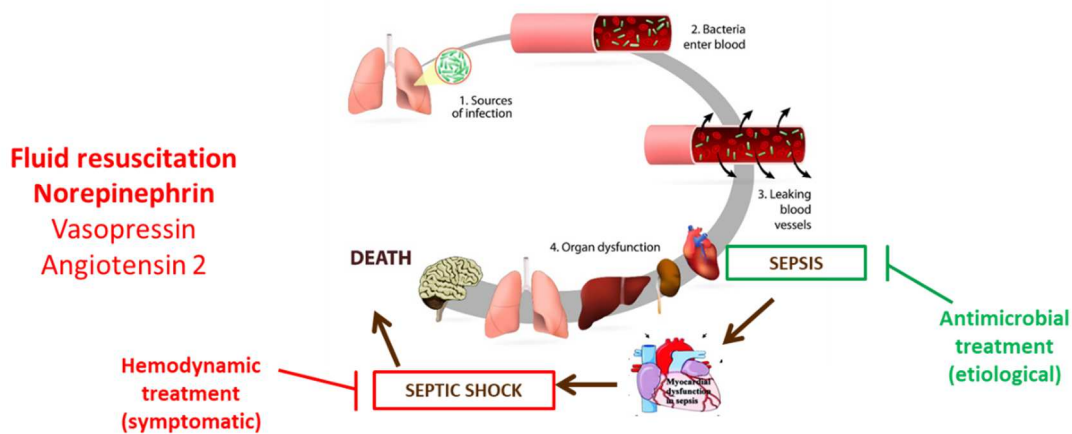


Figure 4. Synthèse de la prise en charge du sepsis

## 2.2. Traitement étiologique : antimicrobien

La SSC (10) recommande la prescription d'antimicrobiens par voie intra-veineuse dès la reconnaissance du sepsis et du choc septique, si possible dans l'heure qui suit (forte recommandation, qualité moyenne des preuves).

Ce traitement antimicrobien doit être probabiliste et de large spectre, en mono ou multithérapie, pour les patients atteints de sepsis ou de choc septique pour couvrir tous les pathogènes de manière empirique (bactérienne, fongique ou virale) (forte recommandation, qualité moyenne des preuves).

De plus une adaptation du traitement est recommandée une fois l'identification des pathogènes et les sensibilités identifiées et/ou une amélioration clinique adéquate observée.

Les prélèvements doivent être faits dans les 45 minutes et ne doivent pas retarder la mise en place de l'antibiothérapie. En effet chaque heure retardant l'intitiation des antibiotiques appropriés augmente le risque de mortalité (73,74). En termes de morbidité plusieurs observations retrouvaient en cas de retard une durée d'hospitalisation prolongée (75), des

défaillances rénales (76), pulmonaires (77) ou en cas de retard majeur une dysfonction d'organes multiple (78).

## 2.3. Traitement symptomatique : hémodynamique

### 2.3.1 Remplissage vasculaire

Lors d'une hypotension symptomatique (marbrures, hyperlactatémie), il est recommandé, sur les 3 premières heures, d'effectuer un remplissage vasculaire de 30ml/kg de cristalloïdes (10). Le remplissage vasculaire doit être évalué afin d'éviter ses effets délétères (79). La précharge dépendance est caractérisée par la faculté du patient à augmenter son débit cardiaque après remplissage vasculaire, elle doit être réévaluée régulièrement par des manœuvres dynamiques (80).

### 2.3.2 Agent vasopresseurs et inotrope

#### 2.3.2.1 Recommandations

La noradrénaline sera initiée dès lors que les objectifs de pression artérielle moyenne ne sont pas atteints (>65mmHg)(10). La SSC recommande l'association de vasopressine (81) si la noradrénaline seule est insuffisante. L'inotrope de choix est la dobutamine si une dysfonction cardiaque (10) apparaît et en dernier, l'usage de l'adrénaline est licite (10).

##### 2.3.2.1.1 Noradrénaline (dose : 0, 1 à 5 µg/kg/min)

Physiologiquement produites par les surrénales, les catécholamines agissent comme neurotransmetteur (Dopamine, Noradrénaline), et hormones (adrénaline, noradrénaline). La noradrénaline agit grâce aux récepteurs adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ), liés aux protéines G avec un

principal effet  $\alpha_1$  vasoconstricteur mais aussi des effets  $\beta_1$  (inotrope et chronotrope positif) et d' autres effets endocriniens à plus hautes doses (  $\beta_2$ )(82).

#### 2.3.2.1.2 Vasopressine (dose : 0.03 UI/minute)

La vasopressine (VASO) sécrétée par la post-hypophyse est une hormone intéressante pour ses effets antidiurétiques. Les récepteurs V1 du muscle lisse des vaisseaux sanguins sont activés par la VASO lui conférant des propriétés vasopressives. Le tableau 5 résume les effets de la vasopressine (Tableau 5).

Tableau 5. Localisation, propriétés moléculaires et action des récepteurs à la vasopressine reproduit d'après (83)

Récepteur	Localisation	Propriétés moléculaires	Action
V1a	Muscle lisse vasculaire, Rein, myomètre, rate, vésicule, testicule, plaquettes, adipocytes, hépatocytes	Activation d'une phospholipase C Libération de calcium intracellulaire	Vasoconstriction
V2 R	Tubule collecteur rénal Cellules endothéliales	Couplage à une protéine G $\uparrow$ AMPc intracellulaire	Réabsorption rénale de l'eau
V3 ou V1b	Hypophyse	Couplage à une protéine G $\uparrow$ AMPc intracellulaire	$\uparrow$ sécrétion d'ACTH
OTRs (récepteur de l'ocytocine)	Utérus, sein, Veine ombilicale, aorte, artère pulmonaire	Activation d'une phospholipase C $\uparrow$ calcium cytosolique Libération de NO	Vasodilatation

#### 2.3.2.1.3 Dobutamine (dose : 3 à 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )

La dobutamine est une catécholamine synthétique qui a une affinité pour les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Elle présente des effets inotrope et chronotrope positifs avec pour conséquences des tachycardies et arythmie à de fortes doses (84). Ses effets sur les vaisseaux sont médiés par une vasodilatation (effet  $\beta_2$ ) à des posologies inférieures à 15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , ainsi qu'une faible



action  $\alpha$ -1 antagoniste. La pression télédiastolique du ventricule gauche est réduite, améliorant la perfusion myocardique (84).

### *2.3.2.2 Autres options*

#### *2.3.2.2.1 Levosimendan*

Agent inotrope et lusitrope positif, le levosimendan agit par sensibilisation des cardiomyocytes au calcium (85). Ce traitement n'a pas montré de bénéfices concernant la prévention des dysfonctions d'organes durant le sepsis (86). Les méta-analyses sur la comparaison du levosimendan et la dobutamine ne mettaient pas en évidence de bénéfices sur la mortalité (10,87).

#### *2.3.2.2.2 Angiotensine II*

L'angiotensine II (AngII), qui est un vasopresseur et inotrope positif, semble être une alternative prometteuse dans le choc vasoplégique réfractaire aux catécholamines, en particulier lors du choc septique (88,89). En effet, l'étude ATHOS-3 a montré un effet bénéfique sur la survie des patients en choc vasoplégique réfractaire présentant une concentration sérique de rénine II élevée (27).

#### *2.3.2.2.3 Adrecizumab*

L'Adrecizumab (connu aussi sous le nom de HAM8101) est un nouveau traitement adjuvant potentiel pour le traitement du choc septique. C'est un anticorps non-neutralisant se liant à l'adrénomédulline (ADM) qui a montré des effets bénéfiques dans les études précliniques(90). L'ADM est une hormone peptidique vasoactive qui joue un rôle important dans le sepsis. L'ADM circulant exerce sur la barrière endothéliale un effet stabilisant et maintient l'intégrité vasculaire (91–94). Les patients septiques ont une concentration plasmatique élevée d'ADM

à l'admission, ce qui est corrélé avec le besoin en catécholamines, les dysfonctions d'organes et la mortalité (95–97). Ainsi, l'ADM peut être une cible thérapeutique intéressante pour le sepsis. L'Adrecizumab (ADZ) réduit les fuites vasculaires, le dysfonctionnement des organes et la nécessité d'un traitement par catécholamines au cours du sepsis induit par la ligature et ponction caecale (CLP) chez la souris, tandis que la diurèse et la survie étaient améliorées (98–100). L'Adrecizumab rétablit la macro-circulation (pression artérielle et débit cardiaque) et diminue le stress oxydatif dans le myocarde dans un modèle CLP de rat(90). L'étude Adrenoss-1 (Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1) (101) a retrouvé, de manière très intéressante, une association entre mortalité à 28 jours et taux de bio-ADM (ADM circulant biologiquement active) élevé à l'admission (> 70 pg/ml ) et la persistance de ce taux élevé après 48h chez les patients hospitalisés en réanimation pour choc septique.

Actuellement, l'ADZ est en cours d'étude phase clinique de II, intitulée Adrenoss-2 chez les patients en choc septique en réanimation (102).

#### 2.3.2.2.4 *Procizumab*

Une autre cible thérapeutique est la dipeptylpeptidase 3, qui est une métalloprotéinase ubiquitaire, impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques mais dont les fonctions biologiques ne sont pas connues(103). La DPP3 est une métalloprotéinase zinc-dépendante qui clive l'extrémité N-terminale de divers peptides bioactifs, dont les angiotensines, les enképhalines et les endorphines(103). La DPP3 hydrolyse principalement l'angiotensine II en angiotensine IV(104,105). L'effet physiologique connu est un effet hypotenseur démontré chez la souris hypertendue (106) ou dépresseur myocardique chez la souris saine(104). La DPP3 est surtout reconnue comme un biomarqueur pronostic dans le choc cardiogénique (104,107), chez le patient grand brûlé (108) et chez le patient septique(90). Le Procizumab® (PCZ), une biothérapie bloquant la DPP3, étudié dans notre

laboratoire dans un modèle de sepsis par ligature ponction caecal chez le rat, restaurait la dysfonction cardiaque et réduisait le stress oxydatif cardiaque (Annexe 1 page 173 (109)).

## 2.4. Autres effets des agents vasopresseurs et inotrope du sepsis connus

### 2.4.1 *Noradrénaline et croissance bactérienne*

A la fin des années 40, suite à une injection intramusculaire d'adrénaline et l'apparition de gangrène gazeuse, D.G. Evans a émis l'hypothèse d'un effet stimulant de l'Adrénaline sur le développement de certaines infections bactériennes (110). Quarante ans plus tard, M. Lyte et *al.* réalisent la première étude *in vitro* dans des conditions proches de celles rencontrées au cours du sepsis démontrant que les catécholamines, et plus particulièrement la NAD, favorisent la croissance de trois espèces de bacilles à Gram négatif (BGN) (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*) (111). Pour cela, ils utilisent un faible inoculum bactérien ( $10^2$  à  $10^3$  UFC/ml), des concentrations de catécholamines dites d'ordre « physiologique » (500  $\mu$ M) et un milieu de culture pauvre, le sérum-SAPI, composé de sérum bovin adulte et d'un mélange de sels minéraux, afin de simuler les conditions de stress rencontrées par les bactéries au cours du processus infectieux. Chez de nombreuses autres espèces bactériennes, l'effet stimulant est retrouvé à des niveaux variables, que ce soit chez les BGN (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Campylobacter jejuni*, ...) ou chez certaines bactéries à Gram positif (BGP) (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*), à un moindre niveau(112). De plus, la NAD augmente l'expression *in vitro* de facteurs de virulence, tels que la toxine Shiga-like d'une souche d'*E. coli* entéro-hémorragique (O157:H7), ou encore des facteurs d'adhésion d'une souche d'*E. coli* entéro-toxinogène (K99) (113,114). Mais ces effets observés ne sont pas entièrement expliqués sur le plan mécanistique.

En utilisant le sérum-SAPI, très pauvre en fer, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que la NAD favorise la croissance bactérienne en facilitant les apports en fer aux bactéries soumises au stress. En effet, le fer est un élément essentiel pour la survie et la croissance des bactéries ; c'est un cofacteur entrant dans la composition de nombreuses enzymes (catalases, peroxydases, cytochromes). Le principal mécanisme des bactéries pour acquérir du fer est la synthèse de chélateurs du fer, appelés sidérophores(115). Ayant une grande affinité pour le fer, ces molécules de bas poids moléculaire sont sécrétées par de nombreuses bactéries et champignons lors de pénurie de fer. Après liaison du complexe sidérophore-Fe<sup>3+</sup>, la translocation intracellulaire se fait *via* des récepteurs spécifiques de surface. Le fer libéré sous forme Fe<sup>2+</sup> est incorporé dans la synthèse protéique bactérienne. Les autres mécanismes impliqués dans l'acquisition de fer sont la mise en jeu d'une activité ferriréductase ou l'interaction avec les protéines de liaison du fer de l'hôte. En effet, si la majorité du fer au sein de l'organisme provient du milieu intracellulaire, le fer extracellulaire est quant à lui essentiellement lié à des protéines de liaison de haute affinité, telles que la transferrine (Tf) et la lactoferrine (Lf). La NAD, à des concentrations physiologiques, se lie avec les ions Fe<sup>3+</sup> par la Tf et la Lf, libérant ainsi du fer des protéines de liaison. *E. coli* va utiliser cette nouvelle source de fer, habituellement non accessible, par l'intermédiaire d'un sidérophore, l'entérobactine, et de son récepteur membranaire, FepA (116–118) (figure 5). Médiée par la NAD, l'assimilation en fer est dépendante de la concentration environnementale. Chez *P.aeruginosa*, en plus de faciliter l'import de fer libéré de la Tf et de la Lf, la NAD réprime l'expression du gène *toxA* et des gènes de la pyoverdine (119).

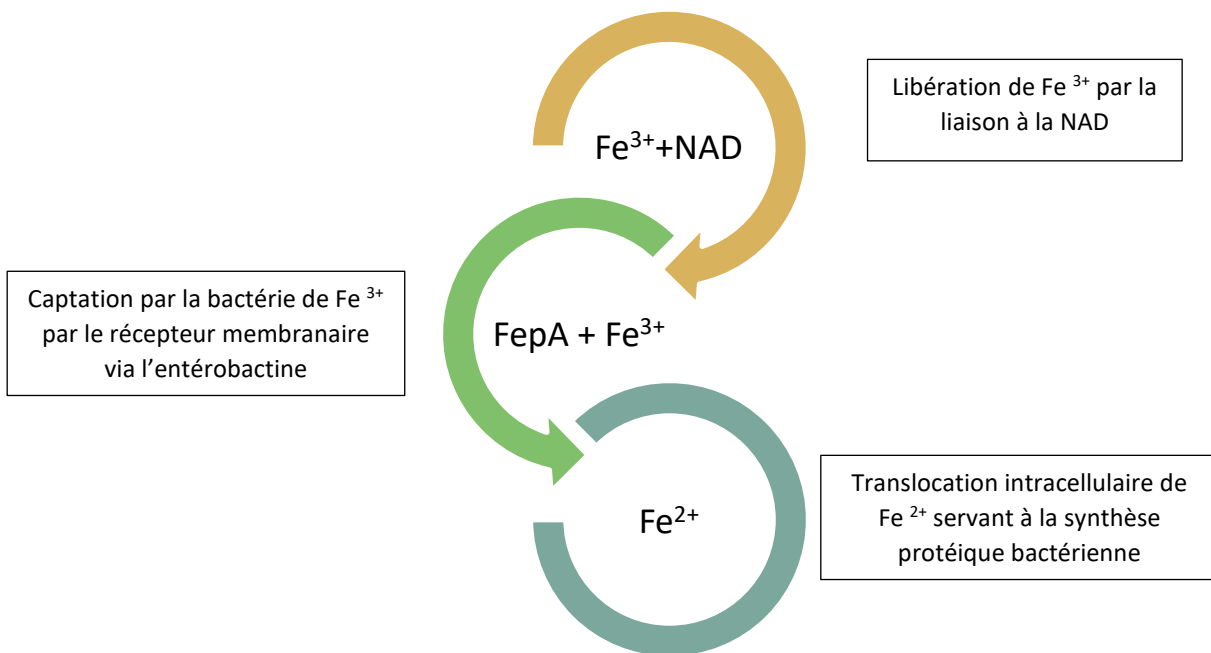


Figure 5. La noradrénaline favorise la libération fer favorisant la synthèse de protéine bactérienne

En plus de ce mécanisme de facilitation de l'import en fer, le mécanisme d'action des catécholamines sur la croissance bactérienne semble également être médié par le Quorum Sensing (QS), phénomène de signalisation impliquant une capacité des bactéries au sein d'une population à communiquer entre elles *via* des signaux moléculaires, appelés "auto-inducers" (AI). Le concept d'endocrinologie microbienne suggère que ces AI peuvent être des hormones circulant chez l'hôte; ainsi, Lyte a montré que le milieu de culture d'*E. coli* en présence de NAD contient un AI de faible poids moléculaire, stable, et que ce milieu favorise à lui seul la croissance d'*E. coli* en l'absence de NAD (112). Quand un AI atteint un seuil critique de concentration, comme c'est le cas pour les hormones neuroendocrines dans le tube digestif, les bactéries reconnaissent et répondent à ce signal en modifiant leurs profils d'expression génique. Chez *E. coli* O157:H7, le gène *luxS* encode pour l'AI-2 et l'AI-3; ce dernier est le signal permettant l'activation de la transcription des gènes *lee* et des flagelles, *via* le système régulateur à deux composants QseBC. L'adrénaline et la NAD interagissent avec ce système,

par le biais de QseC (120). Chez *P.aeruginosa*, le QS consiste en deux principaux systèmes inter-corrélés : *las* et *rhl*. Chacun d'entre eux régule la production de multiples facteurs de virulence(121). Les effets de la NAD sont principalement médiés par la voie *las* du QS.

La frontière entre QS et import de fer reste très floue, notamment avec la notion que la pyoverdine, sidérophore de *P. aeruginosa*, agit également comme une molécule de signalisation pour le QS (122). L'intrication entre les deux phénomènes reste à explorer. Potentiellement, d'autres mécanismes d'action sont encore aujourd'hui inconnus.

La noradrénaline se comporte comme un auto-inducteur, donc comme un « messenger » intervenant dans la communication entre les bactéries favorisant les gènes codant pour la croissance et la virulence bactérienne. De plus, elle se comporte comme un chélateur du fer essentiel à la croissance bactérienne.

#### 2.4.2 *Noradrénaline et réponse immunitaire au cours du sepsis*

On distingue 3 étapes de la réponse immunitaire du sepsis : hyperinflammation, réponse anti-inflammatoire, et immunosuppression.

##### 2.4.2.1 *Réponse inflammatoire et anti-inflammatoire du sepsis*

Pendant le sepsis, il y a un équilibre entre une situation d'hyperinflammation et la réponse anti-inflammatoire.

Une production de cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) se fait une fois les pathogènes reconnus par les *toll-like receptors* (TLR) et les *NOD like receptors* (NLR) (123). Cet état hyperinflammatoire est contrebalancé quasi simultanément par une réponse anti-inflammatoire. Elle est caractérisée par une libération de TGF $\beta$ , de d'IL-10, de médiateurs

lipidiques et en activant des cellules immunorégulatrices et myéloïdes suppressives (124,125).

#### *2.4.2.2 Immunosuppression et sepsis*

Le sepsis peut entraîner un état d'immunoparalysie en affectant l'immunité adaptative (125). Cette immunosuppression est responsable d'épisodes infectieux récidivants par des bactéries, des champignons et des virus (126). Il en résulte une réduction des activités phagocytaires des neutrophiles, une désactivation du couple monocytes/macrophages et une apoptose des lymphocytes. Par ailleurs, la balance va pencher en faveur des cytokines anti-inflammatoires et de la prolifération des cellules MDSC (Myeloid-Derived Suppressive Cells).

#### *2.4.2.3 Catécholamines et réponse immunitaire*

Bien que primordiales dans le traitement du choc septique, les catécholamines peuvent provoquer une dysfonction d'organes lors d'administration prolongée stimulant les récepteurs adrénergiques. Les effets immunologiques peuvent engendrer une immunodépression(82). Les connaissances sur les effets immunologiques progressent mais il est encore nécessaire d'approfondir les explorations, contrairement aux effets délétères au niveau cardiovasculaire qui sont très bien connus (127).

#### *2.4.3 Catécholamines et immunité : effets cellulaires*

Les récepteurs adrénergiques des cellules immunes sont essentiellement  $\beta_2$ . Par ailleurs, l'innervation sympathique des organes lymphoïdes (ganglions, moelle osseuse, rate, thymus) et les catécholamines influencent donc ces cellules. La réponse inflammatoire est autorégulée par des actions paracrines et autocrines par la sécrétion importante de catécholamines des

cellules immunitaires lorsqu'elles sont stimulées (128). Les principaux effets cellulaires des catécholamines sont résumés dans la figure 6.

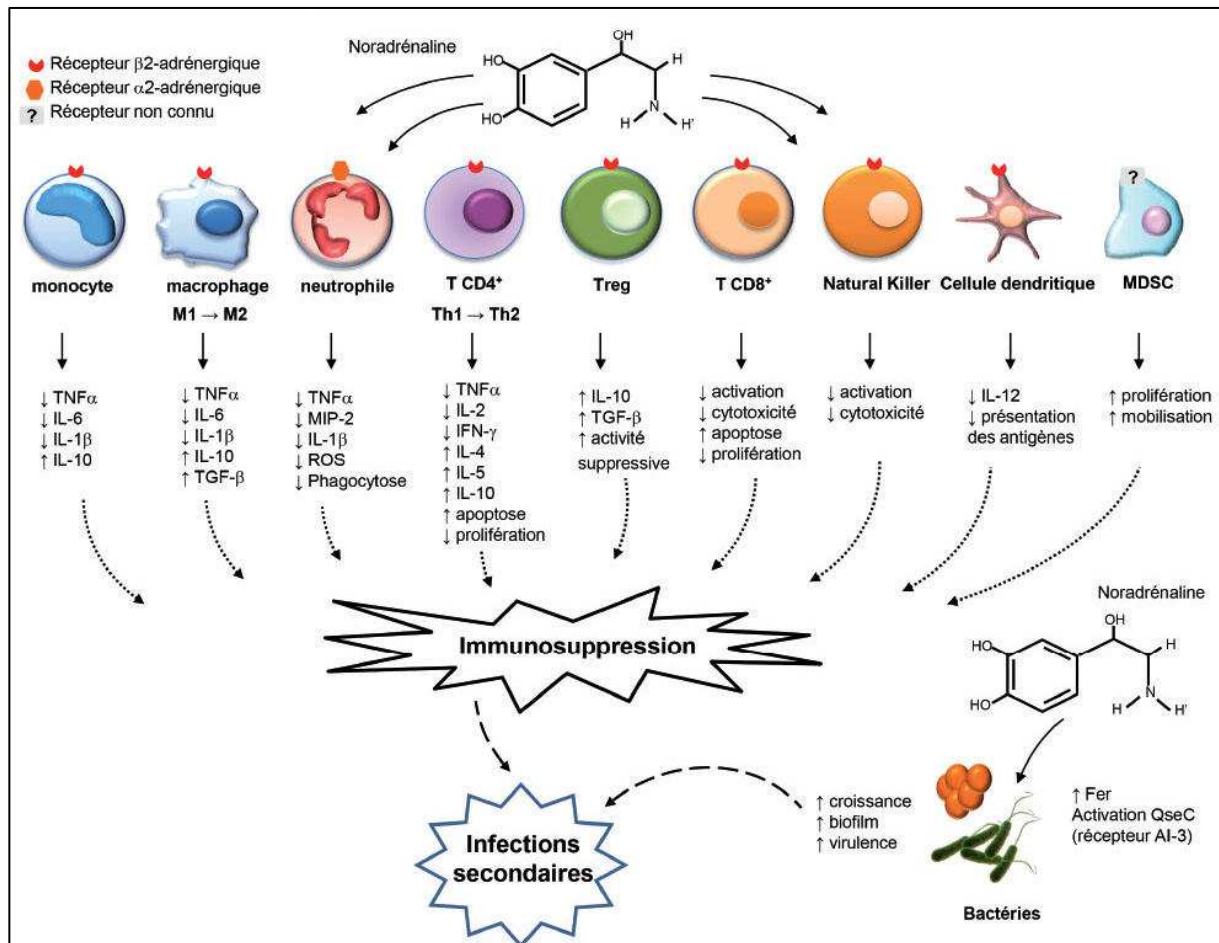


Figure 6. Rôle de la noradrénaline dans la dysfonction immune du sepsis d'après (82)

#### 2.4.3.1 Monocytes/macrophages, neutrophiles et cellules myéloïdes suppressives

L'effet supresseur sur l'immunité innée de la NAD et autres agonistes  $\beta$ -adrénergiques a été démontré par des études *in vitro*, notamment sur la production de cytokines inflammatoires (129,130). La réduction de la production des cytokines inflammatoires se fait par activation  $\beta$ 2-adrénérgique au niveau des macrophages, avec production de cytokines anti-inflammatoires (131). Par un mécanisme dépendant des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénérgiques, chez les neutrophiles la NAD et autres catécholamines réduisent le chimiotactisme, la capacité de



phagocytose bactérienne et la production de cytokines inflammatoires(132,133). Enfin, les catécholamines peuvent stimuler la prolifération et l'activation de cellules immunosuppressives les Myeloid-Derived Suppressive Cells (126).

#### *2.4.3.2 Lymphocytes et cellules dendritiques*

Pour les lymphocytes T, la NAD entraîne l'inhibition de l'immunité adaptative en réduisant la prolifération des lymphocytes (134) et en augmentant leur apoptose (135,136).

Les lymphocytes T CD4+ s'orientent soit vers un profil Th1 ou un profil Th2. Le profil Th1 produit des cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) et Th2 des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-10). Au cours du sepsis, un déséquilibre en faveur de Th2 se fait, engendrant une immunodépression (126). Une activation  $\beta$ 2-adrénérique inhibe les réponses Th1 et en oriente vers le phénotype Th2,(128,137). De plus la NAD supprime la capacité des cellules dendritiques à présenter les antigènes, réduisant ainsi la production de cytokines inflammatoires (138).

#### *2.4.4 Noradrénaline versus Vasopressine*

Un étude récente (139) a montré que la norépinéphrine atténue la production de médiateurs pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène et augmente la production d'IL-10 anti-inflammatoire, à la fois dans les leucocytes humains stimulés par divers ligands inflammatoires et chez les souris stimulées par le LPS. En outre, la perfusion de NAD augmente la dissémination bactérienne dans un modèle murin de sepsis polymicrobien (CLP). De même, chez des volontaires sains soumis à un LPS par voie intraveineuse, la perfusion de norépinéphrine augmente la réponse IL-10 et atténue les concentrations de la cytokine proinflammatoire IFN- $\gamma$ . Le vasopresseur alternatif, la vasopressine, n'exerce aucun effet dans ces schémas expérimentaux. Enfin, pendant un choc septique, des taux de perfusion de

noradrénaline plus élevés sont associés à un équilibre en faveur des cytokines plasmatiques anti-inflammatoires, alors que l'utilisation de  $\beta$ -bloquants est en faveur des cytokines pro-inflammatoires (130,140). La noradrénaline dérègle la réponse immunitaire et compromet la défense de l'hôte. Par conséquent, elle peut aggraver l'immunoparalysie présente pour les patients en choc septique.

### 3. La dipeptidyl peptidase 3

#### 3.1. Généralités

Les dipeptyl-peptidases (DPP) font partie du groupe des enképhalinases. Ce sont des enzymes clivant des peptides opioïdes Il existe 4 groupes d'enképhalinases décrites selon le site catalytique de l'enzyme(141) (les carboxypeptidases, les métallo-peptidases, les sérine-peptidases et les thiolpeptidases). Huit DPP sont connus à ce jour. Le tableau 6 regroupe les DPP et leurs principales caractéristiques.

Tableau 6. Dipeptidyl peptidases connues chez les mammifères reproduit d'après (103)

	<b>Classe peptidique</b>	<b>Localisation infra - cellulaire</b>	<b>Activité</b>	<b>Rôles physiologiques</b>
<b>DPP1</b>	Cystéine peptidase	Lysosome	Exopeptidase Endopeptidase	- Activation des sérines peptidase - Réponse immunitaire - Hydrolyse d'oligopeptides
<b>DPP2</b>	Sérine peptidase	Lysosome	Dipeptidyl aminopeptidase	- Hydrolyse d'oligopeptides
<b>DPP3</b>	Métallo-peptidase	Cytoplasme	Dipeptidyl aminopeptidase	- Turnover protéique - Nociception - Stress oxydant - Régulation pression artérielle
<b>DPP4</b>	Sérine peptidase	Membrane	Dipeptidyl aminopeptidase	- Réponse T cellulaire - Interaction hôte-pathogène - Dégradation matrice extracellulaire
<b>DPP6</b>	Sérine peptidase	Cytoplasme Membrane Noyau	Dipeptidyl aminopeptidase	- Modulation de KCND2 (canal K <sup>+</sup> cardiaque)
<b>DPP8</b>	Sérine peptidase	Cytoplasme	Dipeptidyl aminopeptidase	- Réponse immunitaire
<b>DPP9</b>	Sérine peptidase	Cytoplasme Membrane	Dipeptidyl aminopeptidase	- Hydrolyse protéique
<b>DPP10</b>	Sérine peptidase	Membrane	Protéolyse	- NA

### 3.2. La dipeptidyl peptidase-3 (DPP3)

#### 3.2.1 Généralités

Historiquement purifiée en 1967 à partir de la glande pituitaire de bovin (142), c'est la troisième DPP à avoir été isolée (103). Un site catalytique à motif unique d'acide aminé (AA) HEXXGH (His-Glu-Leu-Leu-X-X-Gly-His) est caractéristique des métallo-peptidases classant la DPP3 dans la famille M49 (figure 7) (143). Le site catalytique présentant deux résidus His contribue à la fixation d'un ion divalent métallique (Zn<sup>2+</sup> principalement, rarement Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> voir Cu<sup>2+</sup>) (144).

	HEXXGH
<i>H. sapiens</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 465
<i>P. troglodytes</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 465
<i>B. taurus</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 465
<i>R. norvegicus</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 465
<i>M. musculus</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 465
<i>G. intestinalis</i>	IHELFGHSTTKLLQESD 458
<i>T. vaginalis</i>	IHELIGHESGRLKQKD 442
<i>S. cerevisiae</i>	IHELLLGHESGKLLTEFT 475
<i>P. stipitis</i>	IHELLLGHESGKLLQETA 463
<i>T. verrucosum</i>	IHELLLGHETGKLLQETS 529
<i>A. benhamiae</i>	IHELLLGHETGKLLQETS 540
<i>N. otae</i>	IHELLLGHETGKLLQETS 521
<i>A. dermatitidis</i>	IHELLLGHETGKLLQETA 464
<i>A. oryzae</i>	IHELLLGHETGKLLQETA 465
<i>P. graminis</i>	NHELLLGHESGKQLTENK 168
<i>C. cinerea</i>	NHELLLGHESGKLFEEYA 448
<i>S. salar</i>	IHELLLGHESGKLFVQDE 464
<i>N. vectensis</i>	IHELLLGHESGKLFIKKP 474
<i>D. melanogaster</i>	IHELLLGHESGKLFRIDE 521
<i>G. morsitans</i>	IHELLLGHESGKLFRINE 459
<i>A. aegypti</i>	IHELLLGHESGKLLRVNE 460
<i>H. saltator</i>	IHELLLGHETGKYFRQMG 464
<i>C. floridanus</i>	IHELLLGHETGKYFKOID 467
<i>S. mansoni</i>	IHELLLGHESGKLFQMSG 452
<i>D. discoideum</i>	IHELIGHESGKLFTDA 446
<i>L. major</i>	IHELLLGHETGKLSENS 443
<i>E. histolytica</i>	IHELLLGHESGKYLR-CD 426
<i>D. donghaensis</i>	IHEVVGHASGQINKGVG 465
<i>F. bacterium</i>	IHEVVGHASGQINEGVA 459
<i>P. ruminicola</i>	IHECLGHESGQLLPQVD 444
<i>S. aurantiaca</i>	IHEVLGHASGQVDDKLG 464

Figure 7. Alignement des séquences d'acides aminés de DPPIII de diverses espèces (103)

### 3.2.2 Présence dans le règne animal

La DPP3 a été retrouvée dans différents tissus humain : dans les cellules sanguines (monocytes et lymphocytes (145) érythrocytes humains (146,147), polynucléaires neutrophiles(148)), liquide céphalo-rachidien (148), cristallin (149,150), neuroblastome (151), muscle (152), peau (153), placenta (154).

Elle a été purifiée aussi chez le rat (153,155–157), chez le porc (158), l'érythrocyte de lapin (159), les cerveaux de singe et de chèvre(160–162), la vipère à écailles du Moyen orient (163), la drosophile (164), la blatte (165) et l'amibe social (166).

Cependant, la DPP3 a également été identifiée dans plusieurs micro-organismes infectieux. En 2003, les séquences complètes du génome de *Porphyromonas gingivalis* (167) (bactérie orale anaérobie stricte à gram négatif asaccharolytique, c'est un pathogène majeur associé à la parodontite adulte, une maladie infectieuse chronique dont souffre un pourcentage

important de la population humaine (168)) et de *Bacteroides thetaiotaomicron* (bacille encapsulé anaérobie strict à gram-négatif. C'est l'une des bactéries les plus courantes du microbiote intestinal humain et c'est aussi un pathogène opportuniste. Son génome contient de nombreux gènes spécialisés dans la digestion des polysaccharides. Elle est souvent utilisée dans la recherche comme organisme modèle pour les études fonctionnelles du microbiote humain (169)). Ces études ont révélé la présence d'une peptidase M49 dans les protéomes de ces deux bactéries anaérobies Gram négatives(170), qui présentent toutes deux une activité DPP3 assez similaire(171). Vukelic et al ont également rapporté le clonage et l'expression hétérologue de la DPP3 du symbiote intestinal humain *Bacteroides thetaiotaomicron*, avec une efficacité catalytique très similaire à celle de l'enzyme humaine (172). Une autre étude a en revanche observé des différences sur le pouvoir inhibiteur des composés hydroxamates synthétisés (inhibiteurs potentiels de la DPP3 testés) vis-à-vis de *Bacteroides thetaiotaomicron* et de la DPP3 humaine. Jusqu'à présent, aucune étude ne décrit un rôle potentiel de la DPP3 dans la physiologie ou la pathophysiologie du microbiote intestinal, surtout par le manque d'inhibiteur spécifique (173). La DPP3 a également été isolée chez *Caldithrix abyssi* (174), une bactérie Gram-négative thermophile et anaérobie isolée d'une cheminée hydrothermale de la dorsale médio-atlantique(175).

La DPP3 a été isolée non seulement chez des bactéries mais aussi chez des parasites, comme dans les cas de paludisme et de leishmaniose.

La DPP3 joue un rôle dans la régulation de la rupture des érythrocytes par le parasite du paludisme *Plasmodium falciparum*. En 2008, Arastu-Kapur et al ont identifié pour la première fois la sérine protéase PfSUB1 et la DPP3 comme des régulateurs clés, car l'inhibition de l'une ou l'autre de ces protéases cibles bloque la libération du parasite des globules rouges de l'hôte (176). Ils ont également observé que de multiples formes transformées de DPP3 existaient

dans la forme mérozoïte du parasite (cycle asexué). Une autre étude a démontré que la DPP1 et la DPP3 étaient associées à la digestion de l'hémoglobine, la DPP3 (considérée comme une maturase générale des protéines sécrétées) pouvant également jouer un rôle dans divers événements de traitement protéolytique en plus de la sortie du parasite (177). En revanche, Lehmann et al ont observé que la sortie du parasite n'était pas bloquée par l'inhibition de la DPP3 mais plutôt par des effets hors cible ou de toxicité, ce qui suggère que l'enzyme ne joue aucun rôle dans le développement et la sortie du parasite intracellulaire. Dans la même étude, il a également été confirmé que la DPP3 réside dans de nouveaux organites sécrétoires apicaux, jouant un rôle dans la fixation des mérozoïtes à la surface des globules rouges, plus précisément dans la reconnaissance initiale des récepteurs membranaires des érythrocytes hôtes (178). Ces résultats ont également été observés par Ghosh et al la même année (179). Une tentative d'identification de nouvelles molécules qui bloquent l'activité de la DPP1 de *Plasmodium falciparum* (la plupart d'entre elles inhibant également la DPP3 de *Plasmodium falciparum*) a permis de découvrir les premiers inhibiteurs allostériques des dipeptidyls peptidases. Cependant, leur faible activité antiparasitaire et leurs effets cytotoxiques contre les cellules humaines à des concentrations micromolaires élevées indiquent que des inhibiteurs plus puissants et spécifiques doivent être conçus pour déterminer si le développement d'inhibiteurs allostériques de la DPP1 est une bonne stratégie pour générer des composés antiparasitaires (180). Une autre étude a montré qu'en se concentrant sur le développement d'inhibiteurs de protéase, uniquement sur la spécificité du substrat, on risque de négliger des caractéristiques structurelles importantes qui peuvent être exploitées pour développer des composés hautement puissants et sélectifs(181).

L'alignement de la séquence de la DPP3 de *Leishmania braziliensis* a montré 43% d'identité avec son enzyme orthologue humaine. La tynorphine et son dérivé, le peptide IVYPW, inhibent

activement l'activité de la DPP3 de *Leishmania braziliensis* et ont un effet néfaste sur la survie du parasite (182).

La DPP3 a également été isolée chez la levure, Watanabe et al ont observé en 1989 que la fraction soluble d'une cellule de *Saccaromyces cerevisiae* contenait une activité hydrolytique envers l'arginyl-arginyl- $\beta$ -naphtylamide (Arg-Arg- $\beta$ NA), démontrant ainsi l'existence de la DPP3 de levure(183). Plus récemment, une autre étude a élucidé la structure cristalline de la DPP3 de levure et étudié ses activités catalytiques par mutagenèse dirigée (184).

Enfin, le gène DPP3 s'est avéré être l'un des gènes de protéase humaine requis pour l'infection et la réplication intracellulaires du virus de l'influenza A, et l'inactivation du gène DPP3 a diminué la réplication du virus sans provoquer de cytotoxicité. La DPP3 était impliquée dans trois voies précédemment identifiées dans les cellules hôtes, en particulier la signalisation CRE/CREB, l'activation NF- $\kappa$ B et l'apoptose(185). Ces résultats suggèrent que la réduction de l'expression du gène DPP3 entraîne l'apoptose des cellules infectées par le virus de la grippe sans que les activités anti-apoptotiques (186) connues de la protéine NS1 de la grippe n'interfèrent. En outre, le gène DPP3 a été identifié comme l'un des gènes significativement associés à l'ampleur de la réponse immunitaire à la vaccination contre la grippe. L'expression du gène DPP3 était significativement augmentée chez les personnes ayant une réponse élevée(187).

### *3.2.3 Localisation intra-cellulaire*

Initialement considérée comme une peptidase de cytosol (146,154), puisqu'il n'a pas été retrouvé de peptide signal dans la DPP3 humaine (hDPP3) (188). Cependant, une activité membranaire a été décrite dans plusieurs études (145,155,160,189). Le processus de présentation de DPP3 à la membrane est inconnu à ce jour(189). Les suppositions mécanistiques sont potentiellement des phénomènes de myristoylation (188) et de phosphorylation (190) qui dirigent certaines protéines à la membrane indépendamment du système de Golgi et réticulum endoplasmique (191–193). Dans le compartiment extra cellulaire, la DPP3 a aussi été retrouvée dans les liquides céphalo rachidien et sérial ou encore le placenta (145,148,194). L'hypothèse la plus probable de la présence de cette enzyme dans ces compartiments est le relargage suite à la mort cellulaire, même si cela n'a pas été démontré (195).

#### *3.2.4 DPP3 et mécanismes d'action*

Par un mécanisme catalytique peu différent de celui de la thermolysine et de la néprilysine la DPP3 clive le dipeptide de l'extrémité N terminale des oligopeptides (196). Deux facteurs importants entrent en ligne de compte pour l'association entre le substrat et son enzyme : La liaison entre la DPP3 et son substrat est déterminée par :

- 1- **L'orientation** du ligand avec la pénétration de la partie C-terminale dans le site catalytique, en exposant ainsi la partie N-terminale du ligand à l'extérieure.
- 2- **La proximité** à moins de 6-7 Å entre l'extrémité N-terminale et l'ion métallique central afin de rendre possible la réaction catalytique.

Par ailleurs, l'adaptation de la DPP3, grâce à une large site catalytique flexible, la rend capable d'hydrolyser tous types de substrats (tableau 7) (103). Cependant, la DPP3 est seulement



capable d'hydrolyser des peptides de longueur comprise entre 3 et 10 AA (196). Malgré certaines incertitudes, une conformation particulière d'un triplé d'arginine rendrait l'adaptation de l'enzyme à son substrat difficile (> 8 AA) (103).

Tableau 7. substrats connus de la DPP3 , tableau reproduit d'après (103)

<b>Substrats</b>
<b>Angiotensines</b>
Ang II, III, IV
<b>Proctoline</b>
<b>Enképhalines</b>
Leu-enképhaline
Met-enképhaline
<b>Endorphine</b>
Endomorphine 1&2
<b><math>\beta</math>-casomorphine humaines</b>
<b>Dérivés dipeptidiques</b>
Arg-Arg- $\beta$ NA
Arg-Arg-MNA
Arg-Arg-NH-Mec
ArgAla/Leu-Arg-NH Nap

Zn<sup>2+</sup> est l'ion le plus fréquemment impliqué primordiale à l'activité des métallopeptidases (103,146). Cependant, au-dessus d'un seuil, la concentration de Zn<sup>2+</sup> inhibe l'activité de DPP3 (146,197). D'autres ions métalliques divalents sont impliqués dans l'activité de la peptidase. Ils sont par ordre de fréquence : Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Ba<sup>2+</sup>(194).

### 3.3 Rôles physiopathologiques de DPP3

#### 3.3.1 Effet intracellulaire

##### 3.3.1.1 DPP III dans les étapes terminales du renouvellement des protéines

Le système ubiquitine protéasome dégrade les protéines cellulaires qui doivent être éliminées (103,198). Les peptides libérés dans les cytosol vont former un peptidome (103) formé d'une ensemble de peptides disponibles pour la cellule (3 à 24 AA) (199). Ces peptides peuvent être clivés et utilisés pour la synthèse énergétique ou protéique des aminopeptidases (103). La

tripeptidyl peptidase II (TPPII) va cliver les longs peptides supérieurs 16 AA et la thimet oligopeptidase (TOP) les peptides compris entre 6 à 17 AA. Ces nouveau peptides sont à leur tour hydrolysés en AA par l'effet concomitant d'aminopeptidases, l'hydrolase aminopeptidase leucotriène A<sub>4</sub> (200), l'hydrolase bléomycine (201) et l'aminopeptidase puromycine (202). Pour finir la DPP3 dégrade les peptides de 4 à 8 AA produits des étapes d'hydrolyse précédente (103) (figure 8).

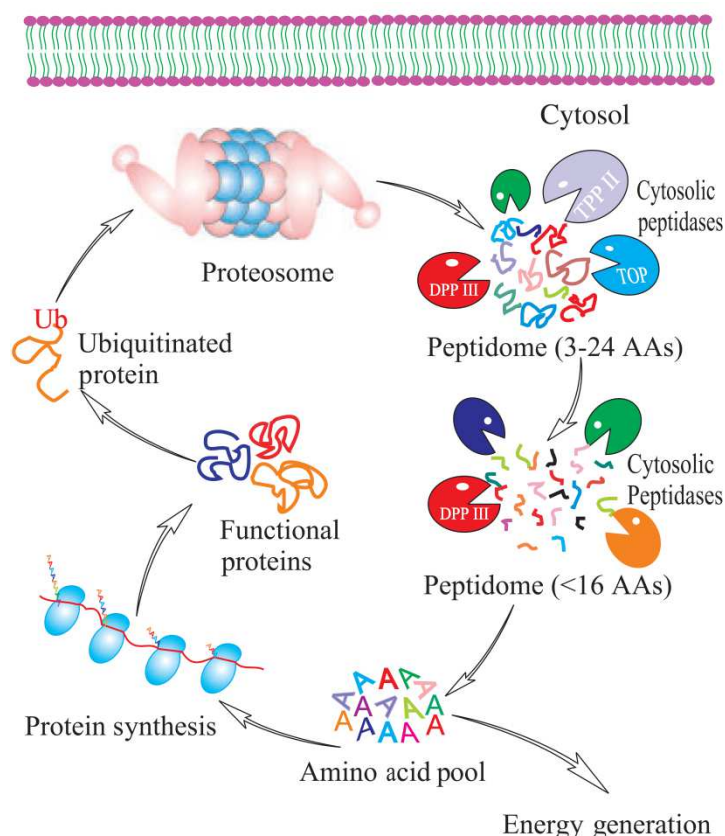


Figure 8. DPP3 et renouvellement protéique cellulaire(103)

### 3.3.1.2 La DPP3 prévient du stress oxydant

En cas de stress oxydant, le facteur de transcription nuclear related factor 2 (Nrf2) est transloqué dans le noyau (103) induisant la transcription de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes (151,203,204). La phosphatidyl inositol 3 kinase et la protéine kinase C vont médier cette translocation induite par une surexpression de DPP3 (151) (figure 9). Par ce passage nucléaire de Nrf2 des protéines anti-oxydantes comme NAD(P)H quinone

oxidoreductase 1 (NQO1) vont être produites suite à l'activation de leurs gènes de codage par DPP3 (103).

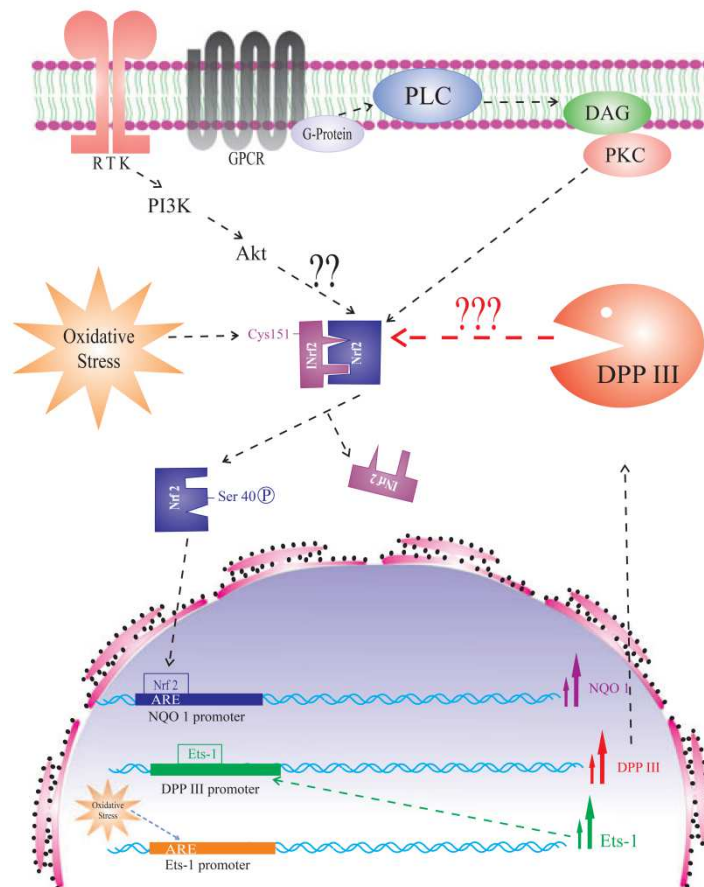


Figure 9. Rôles de la DPP3 au cours du stress oxydant cellulaire

### 3.3.2 Effets extra-cellulaires de la DPP3

Les petits peptides (<10 AA), sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la transduction des signaux cellulaires(205–207), la modulation de la douleur (208,209), la régulation de la pression artérielle (210,211), et la reproduction (212,213).

La DPP3 a une haute affinité pour les enképhalines, les endomorphines et les angiotensines (103,208). Les enképhalines synthétisées par le système neuroendocrinien (214) agissent sur les récepteurs opioïdes de type  $\delta$  et permettent de réduire la douleur du fait de leurs

similitudes avec les dérivés morphiniques (103). Il a été montré que DPP3 était localisée avec les enképhalines au niveau des membranes synaptiques cérébrales de souris (189). De plus, la DPP3 a une activité de clivage privilégiée à pH physiologique vis-à-vis des enképhalines (189) intervenant de fait dans la modulation centrale de la douleur (215,216). Par ailleurs, dans un modèle murin d'Alzheimer l'expression corticale de DPP3 était réduite l'impliquant ainsi dans la survenue de la maladie (189).

Des peptides endogènes les endomorphines (EM 1 & 2) ont une affinité pour les récepteurs responsables dans la perception de la douleur. Les EM se lient aux récepteurs, principalement au niveau du cerveau des mammifères (103). La DPP3 agit donc dans la douleur, le stress, la vigilance en modulant leur fonctions (217). Par ailleurs, l'inhibition de DPP3 par la spinorphine réduisait la douleur par la bradykinine et l'activation de des polynucléaires neutrophiles (145), impliquant la DPP3 dans la régulation des mécanismes inflammatoires (206).

L'angiotensine II, impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques, est essentielle dans le SRAA (106,148,218). La DPP3 joue un rôle dans la catalyse des angiotensines II et IV (106,147,194,219). Sur un modèle de souris hypertendue, l'administration d'Ang II, Pang et al. ont observé un effet hypotenseur de DPP3 avec une diminution de taux d'Ang II (106). Les effets physiologiques de l'hydrolyse de DPP3 sur les autres angiotensines (notamment la 4) sont inconnus actuellement (103).

#### 4. *Escherichia coli* : une bactérie modèle pour l'étude du sepsis

## 4.1 Caractéristiques microbiologiques et habitat

### 4.1.1 Caractéristique microbiologique de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une bactérie appartenant aux *Enterobacteriaceae*, une famille de bactérie possédant des caractéristiques communes. L'habitat des *Enterobacteriaceae* est le tube digestif des vertébrés mais également l'environnement (sol et eau). Les entérobactéries mesurent de 2 à 4 microns et sont des bacilles à Gram négatif. Elles sont mobiles avec une ciliature péritriche, plus rarement immobiles, et poussent aisément sur milieux de culture ordinaires. Elles sont aéro-anaérobies facultatifs et fermentent le glucose en anaérobiose avec ou sans production de gaz, ne réagissent pas au test de l'oxydase et possèdent une nitrate réductase (réduisant les nitrates en nitrites) (220–222). Le genre *Escherichia* est composé de trois espèces *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii* et *E. coli* et de cinq clades d'*Escherichia* classés de I à V(223).

### 4.1.2 Habitat primaire : le tube digestif des vertébrés

*E. coli* appartient à la flore commensale du microbiote intestinale des vertébrés (224). L'habitat primaire de cette bactérie est tractus digestif colonisant les intestins des mammifères et oiseaux ainsi que les reptiles (225). Présente au niveau du caecum et du colon, *E. coli* est localisée au niveau des cellules épithéliales à environ  $>10^6$  UFC (Unité Formant Colonie)/ g de contenu intestinal (226,227). Elle est située exactement dans le mucus de l'épithélium de la paroi intestinale, qui est une niche écologique nutritionnelle à laquelle le métabolisme d'*E. coli* s'est adapté (220). Chez l'homme, sa prévalence est supérieure à 90 % avec une concentration par gramme de fèces de  $10^7$  à  $10^9$  UFC (228,229). *In fine*, *E. coli* est

donc minoritaire par rapport au microbiote anaérobie, mais représente la bactérie aérobie prédominante du microbiote digestif.

#### *4.1.3 Habitat secondaire : environnement*

L'environnement est l'habitat secondaire de *E. coli*. Cette bactérie est présente dans les eaux environnementales *via* les fèces à une concentration d'environ  $10^8$  UFC/g de fèces (230). On la retrouve dans les eaux usées, les lisiers ou les déjections des animaux d'élevage, des animaux sauvages. Du fait de l'adaptation de *E. coli* aux ressources nutritives du tube digestif, l'environnement est généralement moins favorable à la survie de cette bactérie (231).

*E. coli* est soumis à diverses pressions dans l'environnement. Ces pressions sont dites biotiques telles que la compétition entre flore ou la prédation. Lorsqu'il s'agit des facteurs tels que la lumière, la température, l'oligotrophie et la salinité, ces pressions sont appelées abiotiques (232,233).

*E. coli* évolue rapidement vers un état non-cultivable mais viable, et ne peut plus, par conséquent, être détecté par méthode de culture classique (234), mais garde une activité métabolique (235) permettant de se multiplier à nouveau lorsque les conditions sont à nouveau favorables (236).

#### *4.1.4 Un agent commensal mais également impliqué dans des pathologies intra et extra-intestinales*

L'espèce *E. coli* peut également être impliquée dans des pathologies intra-intestinales ou extra-intestinales variées. Les infections intra-intestinales peuvent se présenter selon des degrés de gravité variables, de la diarrhée du voyageur bénigne au syndrome hémolytique et urémique (SHU) gravissime. Parmi les infections extra-intestinales, on pourra citer les infections des voies urinaires (IU), diverses infections intra-abdominales, de la peau et des

tissus mous, des méningites du nouveau-né (MNN), ou des pneumopathies, généralement sur ventilateur mécanique (223). Les bactériémies à *E. coli* sont également une des principales causes de bactériémies et sont généralement identifiées par une porte d'entrée parmi les infections précédemment citées. Ces infections peuvent être très fréquentes (IU) (237), associées à une morbidité élevée (insuffisance rénale dans les SHU chez les enfants (238) séquelles neurologiques dans les MNN (239)) et à une mortalité variable selon le terrain du patient (~15% dans les bactériémies (240,241)).

#### 4.2 Diversité génétique de *E. coli*

La dimension versatile de l'espèce *E. coli* ainsi que la facilité à étudier cette espèce au laboratoire en font un excellent modèle d'étude sur les dimensions phénotypiques, génotypiques, évolutives, ou en expérimentation animale.

Le génome moyen de *E. coli* comporte entre 3900-5800 gènes correspondant à 4.2-6 Millions de paires de bases (242–244). Cette variabilité a été particulièrement mieux objectivée avec le développement du séquençage de génomes complets depuis une dizaine d'années (224) et a permis de faire émerger les concepts de core génome, génome accessoire et pangénome (figure 10 ).

Le core génome regroupe environ 2000 gènes communs à tous les isolats décrits au sein de l'espèce *E. coli*. Ces gènes sont considérés comme essentiels aux fonctions de base de la bactérie. Le génome accessoire est un répertoire de gènes présent uniquement chez une partie de la population. Enfin le pangénome est le répertoire total des gènes présents au sein de tous les individus de l'espèce compris entre 15000 et 75000 gènes (242,243,245,246).

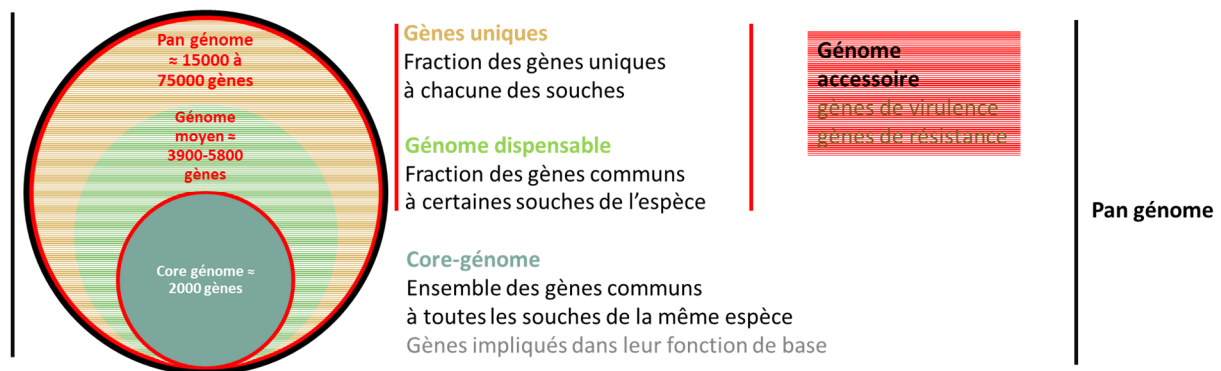


Figure 10. Génomes bactériens : Core génome et pan génome (d'après(223))

Cette diversité génétique est liée à des phénomènes de mutations ponctuelles et surtout de délétions ou d'insertions de grands fragments chromosomiques. Dans certains cas, ces insertions peuvent être associées à des facteurs de virulence au sein de structures dénommées « îlots de pathogénicité ». Par ailleurs, les phénomènes de recombinaison homologue, qui permettent une recombinaison génétique de séquences d'ADN généralement proches, sont particulièrement fréquents chez *E. coli* et concourent encore à cette diversité (247).

#### 4.3 Méthodes utilisées pour l'étude de la diversité génétique de *E. coli*

Avant l'ère du séquençage de génomes entiers, l'étude de la diversité de *E. coli* reposait généralement sur des approches "minimalistes" reposant sur des caractéristiques limitées mais déterminantes pour une discrimination pertinente des isolats de *E. coli*.

Cette approche peut être réalisée à différents degrés, de l'étude de marqueurs très généraux, jusqu'à une étude plus fine permettant la compréhension à l'échelle du clone. Les principaux éléments de classification et leurs méthodes sont les suivants :



### 4.3.1 Groupe phylogénétique

Comme nous l'avons vu précédemment, le genre *Escherichia* est composé de trois espèces et de cinq clades d'*Escherichia* (223). Ces clades ne se distinguent pas phénotypiquement de *E. coli* mais divergent à divers degrés au niveau des nucléotides de *E. coli*. Il présente une forte structure phylogénétique représentant au moins huit groupes phylogénétiques répartis en deux groupes principaux : les phylogroupes B2, G, F et D ; et les phylogroupes A, B1, C et E (223). Les études épidémiologiques ont bénéficié de méthodes faciles et rapides basées sur la PCR, qui permettent de déterminer les phylogroupes (248–250), les clades (251) et les espèces d'*Escherichia* (230,252–254) d'être déterminées.

La PCR Clermont utilise une approche simple de PCR multiplex permettant de distinguer chacun des groupes phylogénétiques (248)(figure11).

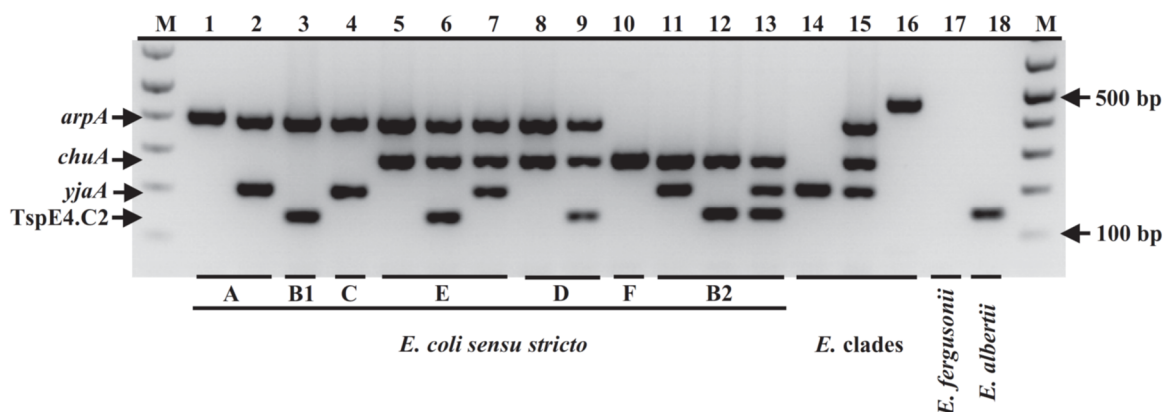


Figure 11. PCR quadruplex d'après Clermont et al. (248)

### 4.3.2 MLST (Multilocus sequence typing)

C'est une technique de biologie moléculaire permettant le typage de locus multiples. La procédure caractérise les isolats d'espèces microbiennes en utilisant les séquences d'ADN des fragments internes de plusieurs gènes de ménages répartis sur l'ensemble du génome. Des

fragments internes d'environ 450 à 500 pb de chaque gène sont utilisés, car ils peuvent être séquencés avec précision sur les deux brins par séquençage Sanger, une technologie de séquençage abordable depuis les années 1990. Pour chaque gène de ménage, les différentes séquences présentes au sein d'une espèce bactérienne sont attribuées à des allèles distincts et, pour chaque isolat, la combinaison des allèles de chacun des locus définissent un profil allélique ou *Sequence Type* (ST)(255).

Pour *E. coli*, 2 bases de MLST différentes existent :

- une base proposée par l'université de Warwick reposant sur l'étude de 7 gènes de ménage (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) (256). C'est le schéma le plus utilisé en épidémiologie moléculaire.
- une base proposée par l'institut Pasteur reposant sur l'étude de 8 gènes de ménage (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA*)(257). Ce schéma est moins utilisé sur le plan épidémiologique mais il est plus pertinent d'un point de vue évolutif.

#### 4.3.3 Typage des antigènes somatiques ou flagellaires

Comme toutes les autres entérobactéries, *E. coli* possède trois antigènes majeurs. La méthodologie de sérotypage utilisée pour la classification de *E. coli* est un schéma historique décrit par Kauffmann en 1947 (258).

L'antigène somatique O (Ag O) est un élément de la membrane externe des bacilles à Gram négatif formé de lipopolysaccharide. La synthèse de l'antigène O est sous le contrôle de l'opéron *rfb*.

L'antigène flagellaire H (Ag H) est de nature protéique et entre dans la construction du flagelle, permettant la mobilité de la bactérie. Il est généralement codé par le gène *fliC*. Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobiles.

L'antigène capsulaire K (Ag K) est un élément polysaccharidique facultatif pouvant concourir à la virulence de la souche, notamment *via* une résistance à la phagocytose.

Il existe un polymorphisme important de ces antigènes. De ce fait, ce sont donc des cibles historiques, qui ne nécessitent pas de méthode moléculaire mais des méthodes d'agglutination basées sur l'utilisation de sérums spécifiques.

#### 4.3.4 Diversité allélique de *FimH*

Un trait qui a été considéré comme important, à la fois pour l'écologie normale et pour la pathogénicité, est la production de facteurs adhésifs spécifiques aux tissus, fréquemment trouvés sous la forme de structures superficielles ressemblant à des poils, appelées *fimbriae*. Plus de 95% des isolats d'*E. coli* expriment des *fimbriae* de type 1, également appelés *fimbriae* sensibles au mannose ou *fimbriae* communs (259,260). L'expression des *fimbriae* de type 1 n'est peut-être pas nécessaire au maintien d'*E. coli* dans le côlon (261,262), mais elle confère à *E. coli* un avantage significatif pour la colonisation transitoire de la porte oropharyngée qui est importante pour la transmission fécale/orale normale d'*E. coli* entre les hôtes individuels (262,263). En plus de ce rôle essentiel dans l'écologie commensale, les *fimbriae* de type 1 sont également importants pour la pathogénèse des infections des voies urinaires (UTI) (264,265). Le phénotype adhésif sensible au D-mannose des *fimbriae* de type 1 dépend de l'activité de type lectine d'une sous-unité de 30 kDa située à l'extrémité, *FimH* (266,267). Des variantes phénotypiques naturelles de la protéine *FimH* sont connues (268,269). Tous les allèles de *FimH*, étudiés à ce jour, codent pour des sous-unités qui ont des niveaux élevés d'affinité aux structures de tri-mannose (M3 ;  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-6-D-mannotriose), seulement certains variants permettent une adhésion de haut niveau aux résidus monomannoses (M1) parmi les variants de *FimH* (270). Ces variations d'adhésivité sont dues uniquement à des différences

structurelles de FimH qui affectent la spécificité du récepteur de la lectine mais n'affectent pas la morphologie des fimbriaux ou le niveau de fimbriation (269,270). Ainsi, tous les fimbriae de type 1 peuvent être fonctionnellement subdivisés en phénotypes FimH à faible liaison à M1 (M1L) ou à forte liaison à M1 (M1H). On a constaté que les souches d'*E. coli* présentant ces deux phénotypes de base prédominent dans des niches différentes. La plupart des isolats du gros intestin des humains sains (environ 80 %) expriment un phénotype M1L distinct, tandis que la plupart des isolats des infections urinaires (plus de 70 %) expriment des variants M1H FimH (269). Le typage de l'allèle FimH est basé sur les variations mineures de la séquence (271) et présente donc un déterminant pertinent pour le typage des souches de *E. coli*.

L'ensemble des données de phylogroupe, de ST, de typage somatique et flagellaire, d'allèle de FimH permet donc de donner une sorte de "carte d'identité" à une souche d'*E. coli*. Cette carte d'identité permet l'identification de certains clones à succès, et potentiellement de mieux comprendre l'association entre une pathologie et le fond génétique d'un clone de *E. coli*.

#### 4.3.5 Autres paramètres étudiés

D'autres paramètres peuvent être étudiés chez *E. coli* tels que l'étude du virulome ou du résistome, le contenu en gènes de virulence ou de résistance, mais ne se seront pas abordés ici.

#### 4.3.6 Apport du séquençage à haut débit

Le recours de plus en plus facile aux technologies de séquençage à haut débit permet désormais un accès maximaliste à l'ensemble de données des génomes bactériens. De ce fait, la majorité des observations décrites ci-dessus sont désormais obtenus *in silico*. En pratique,

l'ADN bactérien est extrait puis séquencé. Les différentes données obtenues précédemment, de façon parfois laborieuse, sont désormais obtenues à partir du séquençage de génome complet par des outils de bio-informatique (272). Ce type d'approche permet également une approche plus fine de la diversité clonale et les microbiologistes sont désormais en mesure d'étudier la différence entre deux clones très proches, de l'ordre de quelques mutations à l'échelle d'un génome (272).

#### 4.4. Groupes phylogénétiques, commensalisme et infections.

Certaines souches ont été décrites comme étant à l'origine d'infections du système gastro-intestinal (*E. coli* pathogène intestinal) tandis que d'autres provoquent des infections en dehors du système gastro-intestinal (*E. coli* pathogène extra-intestinal, ExPEC) (222,273). Les ExPEC sont impliqués dans un grand nombre d'infections extra-intestinales telles que les infections des voies urinaires, les infections sanguines, les pneumonies, les infections de la peau et des tissus mous et les méningites néonatales (221). *E. coli* reste la principale cause d'infections urinaires, et des enquêtes récentes ont signalé l'émergence d'*E. coli* comme cause prédominante d'infections nosocomiales et de septicémies néonatales (274).

Des études phylogénétiques ont montré que les *E. coli* se répartissent en quatre groupes phylogénétiques principaux : A, B1, B2 et D (figure 12). Les souches humaines d'ExPEC appartiennent généralement au groupe B2, plus virulent, et dans une moindre mesure au groupe D. Les souches commensales, considérées comme moins virulentes, appartiennent aux groupes A ou B1 (249). Les souches ExPEC possèdent un large éventail de facteurs de virulence (FV) responsables de la pathogénèse, qui sont fréquemment codés par des îlots pathogènes et d'autres éléments d'ADN mobiles(275). Les FV des ExPEC comprennent des toxines, des

adhésines, des systèmes d'acquisition du fer (sidérophores), des protéines de synthèse de la capsule, des protectines et des invasines(276).

Cette diversité de groupes phylogénétiques, responsable d'infections diverses selon le fond génétique, impose l'utilisation de collection avec une variété de souches large afin d'être représentative de l'espèce pour être pertinente lors d'étude mécanistique et clinique(277)

#### 4.5. Pathovars

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont généralement classées en pathotypes (également connus sous le nom de pathovars) (222,278)et sont identifiées à l'aide d'acronymes. La définition de ces pathotypes peut être basée sur différents critères, tels que l'organe cible (*E. coli* uropathogène (UPEC)), l'hôte infecté (*E. coli* pathogène aviaire (APEC)), l'association avec un organe et un hôte (la méningite néonatale à *E. coli* (MNEC)), l'association avec les organes ciblés et la virulence de la bactérie gènes spécifiques (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)), la pathologie causée par les souches (diarrhée et *E. coli* pathogène intestinal (InPEC)), la présence d'un ou de plusieurs gènes spécifiques (*E. coli* producteur de Shiga-toxine (STEC)).

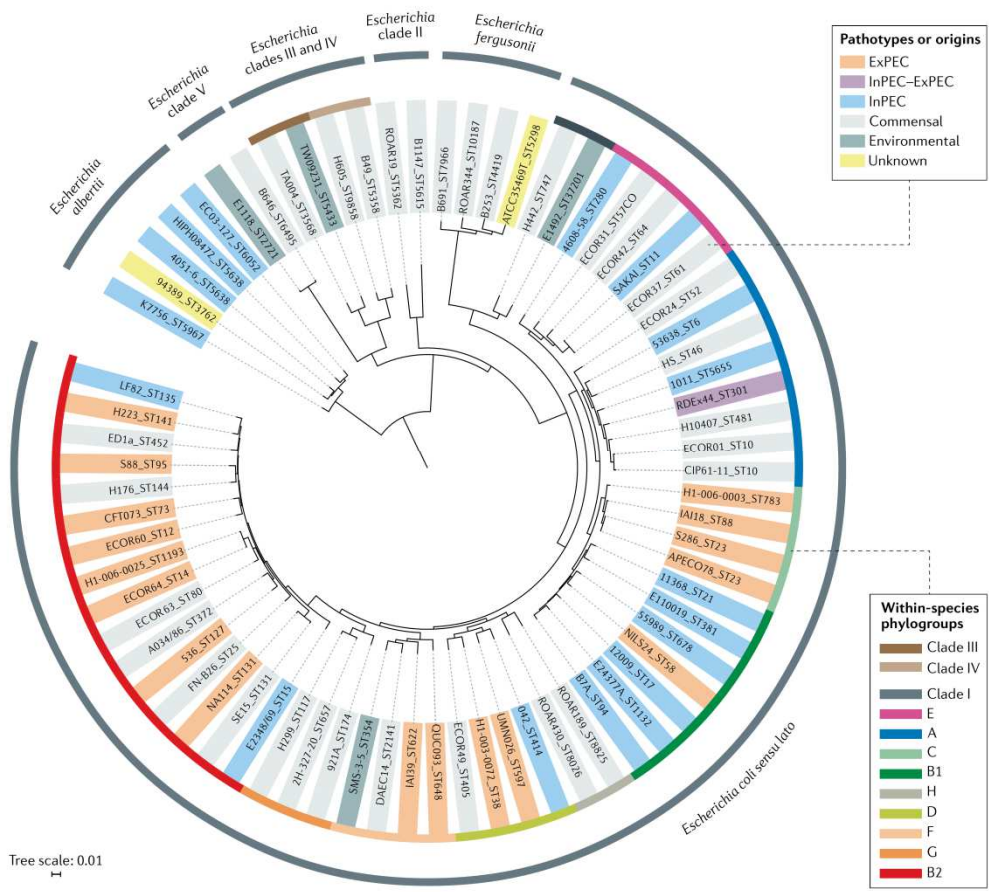


Figure 12. Histoire phylogénétique d'*Escherichia coli* d'après (223)

## Objectifs généraux du travail



## Objectifs généraux du travail

Les objectifs de notre travail étaient donc les suivants :

- (i) Etude de l'écologie bactérienne dans un modèle murin de péritonite stercorale.
- (ii) Comparaison de l'effet de la noradrénaline, d'angiotensine II, de la vasopressine et du Procizumab® sur la croissance bactérienne d'une collection représentative de la diversité génétique de *E. coli* dans des milieux mimant différents compartiments de l'organisme. Pour aller plus loin, les effets microbiologiques des mêmes agents vasopresseurs ont été réalisés sur notre modèle murin de péritonite stercorale.

Afin d'atteindre les objectifs, le plan reposait sur :

- L'utilisation d'un modèle de défaillance cardio-circulatoire d'origine septique (cardiomyopathie septique) chez le rat par l'induction d'une péritonite stercorale, par la technique de ligature et ponction caecale.
- En associant des mesures physiologiques, biochimiques, biologiques et microbiologiques
- L'utilisation d'une collection bactérienne représentative de l'espèce *Escherichia coli* : La collection NLS
- L'utilisation d'un anticorps bloquant spécifiquement la DPP3 (Procizumab).

Un article publié sera développé ainsi qu'un second article actuellement en préparation :

Article 1: "Analysis of blood culture in a rat model of cecal ligation and puncture induced sepsis" publié dans *Intensive Care Medicine experimental*".

Article 2 : « Effets des vasopresseurs du sepsis et du Procizumab® sur la croissance bactérienne de *E. coli*. »

Partie 1: Article 1

Analysis of blood culture in a rat model of cecal ligation and puncture induced sepsis

# La ligature ponction caecale : un modèle expérimental de sepsis plurimicrobien

## 1. Introduction

En 2018, de nouvelles recommandations ont été publiées par un consensus d'experts internationaux de l'expérimentation animale pour améliorer la qualité des modèles préclinique de sepsis (279). Ces experts concluaient que la modélisation animale de certaines pathologies, bien qu'utile pour l'Homme, était limitée par sa mauvaise application (280,281). Ceci était souvent due à la faible reproductibilité et fidélité des modèles disponibles (282,283), à des plans d'études inappropriés (281) et à l'utilisation sélective des résultats issus des données animales (284,285).

Alors que la définition clinique du sepsis (3) et les lignes directrices de la Surviving Sepsis Campaign (SSC) pour la prise en charge des patients ont été mises à jour trois fois (286), la recherche préclinique sur le sepsis n'avait fait pas fait l'objet de recommandations pour standardiser et améliorer les pratiques (287). L'absence de standardisation rigoureuse des modèles précliniques limite leur utilité clinique pour faire progresser la prise en charge des patients septiques (288,289) et réduit ainsi les possibilités d'identifier et de tester de nouvelles thérapies.

Le modèle de ligature et de ponction cœcale (LPC) est considéré comme le modèle de référence pour étudier le sepsis chez le petit animal. À ce jour, aucune recommandation concernant le choix de la thérapie antimicrobienne n'est disponible. De plus, l'écologie bactérienne du modèle de sepsis induit par LPC chez le rat n'avait jamais été réalisée à ce jour. Ainsi, notre étude portait sur les objectifs suivants :

- Identifier l'écologie microbienne dans le modèle de sepsis induit par LPC dans la littérature récente de 2018 et 2019.
- Evaluer la concordance entre les thérapies antimicrobiennes et la microbiologie documentée dans le modèle de sepsis induit par LPC.

## 2. Méthodologie

Seize rats mâles Wistar, âgés de 9 à 12 semaines et pesant de 350 à 450 g, ont été obtenus chez Janvier (St Berthevin, France). Les rats ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de chlorhydrate de kétamine (90 mg/kg) et de xylazine (9 mg/kg). Le sepsis a été provoqué par LPC comme décrit précédemment (290). Une incision ventrale de la ligne médiane (1 cm) a été pratiquée pour permettre l'extériorisation du cæcum. Le cæcum a ensuite été ligaturé juste en dessous de la valve iléocæcale et ponctionné une fois dans la partie proximale du caecum avec une aiguille de 18 gauge pour induire un modèle de haut grade. La cavité abdominale a été fermée en deux couches, et les rats ont reçu une réanimation liquidienne (3 ml/100 g de poids corporel) de solution saline, injectée par voie sous-cutanée. Une injection intrapéritonéale de 75 µg/kg de buprénorphine a été utilisée à des fins analgésiques en période préopératoire. La douleur a été évaluée en utilisant des feuilles de score de l'échelle visuelle analogique après la LPC, et l'analgésie a été obtenue en utilisant la buprénorphine si nécessaire. Une injection de 75 µg/kg de buprénorphine en intrapéritonéal sera réalisée à visée analgésique en pré-opératoire. L'accès à l'eau et à la nourriture sera libre. La douleur sera évaluée et si besoin l'analgésie renforcée par une injection de 50 µg/kg de buprénorphine intrapéritonéale. Selon notre expérience (cf saisine antérieure), les animaux commencent à présenter des signes physiques de sepsis vers la 20ème heure. Ainsi, si les animaux sont algiques le lendemain matin, un renforcement de l'analgésie sera effectué. En cas d'observation de points limites, l'animal sera mis à mort afin de lui éviter toute souffrance. Seize heures plus tard, après une anesthésie générale au chlorhydrate de kétamine (90 mg/kg) et à la xylazine (9mg/kg), les rats ont été placés en position couchée et trachéotomisés avec un cathéter de 16 G et ventilés à l'aide d'un respirateur pour rongeurs avec une fréquence respiratoire fixée à  $53,5 \times \text{poids}^{-0,26}$  et un

volume courant fixé à 6,2 x poids<sup>1,01</sup> (90). La température rectale a été maintenue tout au long du protocole entre 37-37,5°C par un tapis chauffant. Des cathéters ont été insérés dans la veine jugulaire gauche pour administrer de la solution saline à 1mL/h à la seringue électrique et dans l'artère carotide droite pour la surveillance de la pression artérielle invasive. Une étude de survie a été réalisée historiquement sur ce modèle au laboratoire et non reproduite dans le cadre de la thèse. La reproductibilité du modèle était attestée après une phase d'entraînement. L'objectif étant d'avoir des animaux en choc septique avec une pression artérielle moyenne <65mmHg et pouvant survivre au moins 3 heures respectant le protocole validé par le comité d'éthique de l'Université de Paris (numéro de protocole S140 #9385).

Le sang a été recueilli sur le cathéter veineux, et le liquide péritonéal à l'aide d'une seringue stérile après sacrifice de l'animal après laparotomie. Les hémocultures ont été prélevées dans des flacons aérobies (BacT/ALERT® FA plus) et anaérobies (BacT/ALERT® FN plus) (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France), et placées dans l'incubateur BacT/ALERT® VIRTUO®, à 37 °C pendant 5 jours. Les flacons d'hémoculture positifs étaient repiqués sur géloses au sang (en conditions aérobies et anaérobies) et géloses au sang cuit Polyvitex (sous 5% de CO<sub>2</sub>) à 37°C après coloration de Gram. Toutes les géloses provenaient de chez Biomérieux (Marcy L'Etoile, France). Les micro-organismes ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) (Microflex Bruker Daltonics/BioTyper™ version 2.0, Wissembourg, France).

### 3. Publication dans Intensive care medicine experimental

Vaittinada Ayar et al. *Intensive Care Medicine Experimental* (2020) 8:18  
<https://doi.org/10.1186/s40635-020-00310-6>

Intensive Care Medicine  
Experimental

LETTER TO THE EDITOR

Open Access

## Analysis of blood culture in a rat model of cecal ligation and puncture induced sepsis



Prabakar Vaittinada Ayar<sup>1,2,3\*</sup> , Hervé Jacquier<sup>3,4,5</sup>, Benjamin Deniau<sup>2,3,6</sup>, Ferial Azibani<sup>2,3</sup>, Alexandre Mebazaa<sup>2,3,6</sup> and Alice Blet<sup>2,3,6</sup>

\* Correspondence: [pvaittinada@gmail.com](mailto:pvaittinada@gmail.com)

<sup>1</sup>Emergency Department, Beaujon Hospital, AP-HP, 100, Boulevard du Général Leclerc, 92300 Clichy, France

<sup>2</sup>INSERM UMR-S942 MASCOTT, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

To the Editor,

Sepsis shows a high incidence and is associated with a high mortality [1, 2], and experimental studies are useful for a better understanding of sepsis and for identifying new therapies [3].

The cecal ligation and puncture (CLP) model is considered as the gold standard experiment for studying sepsis in animals. Recent guidelines recommend resuscitating animals after performing CLP including administration of fluid and chosen antimicrobials based on known pathogens. However, microbial identification is not a common practice in pre-clinical models of sepsis.

The aims of this original study were:

- To assess microbial situation in CLP-induced sepsis in the recent literature
- To document microbiology of blood cultures in rat CLP-induced sepsis performed in our lab.

#### Keyword-based review

The review was performed on PubMed using “CLP” and “rat” keywords for English-written papers in 2018 and 2019 and also for “mouse” and “CLP.” Bacteriological documentation and antimicrobial therapy were collected.

#### CLP model in rats

Sixteen Wistar male rats, from 9 to 12 weeks of age weighing 350 to 450 g were obtained from Janvier (St. Berthevin, France). CLP model was performed as previously described [4, 5]. Septic shock was reached 16 h after induction by CLP, and blood samples were collected by jugular withdrawn. Culture and bacteriological analysis were done as previously described [6, 7].

#### Keyword-based review revealed a few administrations of antibiotics in CLP models

Our keyword-based review performed on PubMed resulted in 176 publications between 2018 and 2019 for rats. Among them, 22 (12.5%) were excluded for a different



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

**Table 1** Blood culture analysis of 16 rats 16 h after CLP

	rat n°																N° of occurrences
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>Escherichia coli</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
<i>Enterobacter cloacae</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
<i>Streptococcus oralis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
<i>Lactobacillus murinus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1

meaning of CLP acronym. In only 15% (23/154), antimicrobial therapy has been used, mostly (57%) the third generation cephalosporin (ceftriaxone) (Table S1).

For mice, 59 (14.6%) of 405 studies were excluded. In 18% (62/346), antibiotics have been administered, mostly (47/62, 76%) the carbapenem (imipenem/ertapenem) (Table S2).

However, none of the studies performed microbiological documentation before treatment.

**Blood culture analysis 16 h after sepsis induction**

In 16 CLP rats, *Escherichia coli* 88% (14/16), *Enterococcus faecalis* 81% (13/16), and *Enterobacter cloacae* 75% (12/16) were the main pathogens found in blood cultures (Table 1). All bacteria exhibit a wild-type phenotype for antimicrobial agent susceptibility.

Our literature review about CLP-induced sepsis showed that antibiotherapy and bacteriological documentation was not reported in experimental models.

Blood cultures in our CLP model frequently identified 3 bacteria, in accordance with common polymicrobial infections in stercoral peritonitis in humans. Further, similar microbial profile (*Enterobacteriaceae* and *Enterococci*) was also found between our CLP model and human peritonitis [8].

By analyzing antimicrobial susceptibility testing, all bacteria exhibit a wild-type phenotype. Carbapenems definitely proved to be the most congruent antibiotics in our model. However, antimicrobial narrow spectrum therapy, including cotrimoxazole, seemed appropriate (Table 2).

To conclude, our literature search shows that antimicrobial therapy is not daily used in the treatment of CLP-induced sepsis, and when used, no bacterial identification is performed. Our data indicates that blood culture is readily available and may give a correct indication on which antimicrobial therapy to use in CLP-induced sepsis.

**Table 2** In vitro susceptibility (minimal inhibitory concentration (µg/mL)) of the organisms identified in the blood culture in our CLP rats (n = 16) to antimicrobial drugs

	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i>
Imipenem	0.38	0.38	1
Tazocillin	2	2	2
Cotrimoxazole	0.6	0.125	0.016
Levofloxacin	0.06	0.06	1



## Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00310-6>.

**Additional file 1: Figure S1.** Peritoneal fluid culture analysis of 16 rats 16 hours after CLP

**Additional file 2: Table S1.** Probabilistic antimicrobial therapy used in rat CLP models in the literature published in 2018 and 2019

**Additional file 3: Table S2.** Probabilistic antimicrobial therapy used in mouse CLP models in the literature published in 2018 and 2019

### Abbreviation

CLP: Cecal ligation and puncture

### Acknowledgements

Not applicable

### Authors' contributions

PVA and AB designed the experiments. PVA and BD performed the experiments and collected the blood samples. PVA and HJ performed the bacteriological analysis. All authors discussed the data, drafted or revised critically the manuscript for important intellectual content, and approved the final manuscript.

### Funding

None

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Ethics approval and consent to participate

All experiments using laboratory animals were conducted in our lab in accordance with the National and European Institutes of Health guidelines and were approved by the local animal research ethics committee (Lariboisière-Villemin, Paris, France) (APAFIS#9385-2016113016181432 v4).

### Consent for publication

Not applicable

### Competing interests

All other authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Emergency Department, Beaujon Hospital, AP-HP, 100, Boulevard du Général Leclerc, 92300 Clichy, France. <sup>2</sup>INSERM UMR-S942 MASCOTT, Paris, France. <sup>3</sup>University of Paris, Paris, France. <sup>4</sup>Laboratory of Microbiology, Department of Infectious Agents, Lariboisière Hospital, AP-HP, Paris, France. <sup>5</sup>INSERM, IAME, UMR 1137, Paris, France. <sup>6</sup>GH St-Louis-Lariboisière, Department of Anesthesiology, Critical Care and Burn Unit, St-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France.

Received: 7 February 2020 Accepted: 25 May 2020

Published online: 05 June 2020

### References

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ et al (2016) Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193:259–272 <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395:200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
3. Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S et al (2018) Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTIPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Intensive Care Med* 6:26 <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0189-y>
4. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA (2009) Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4:31–36 <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>
5. Blet A, Deniau B, Geven C et al (2019) Adreclizumab, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats. *Intensive Care Med* 7:25 <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0255-0>
6. Amarsy-Guerle R, Mougari F, Jacquier H et al (2015) High medical impact of implementing the new polymeric bead-based BacT/ALERT® FAPlus and FNPlus blood culture bottles in standard care. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:1031–1037 <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2319-8>

7. EUCAST The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf). Accessed 27 Nov 2019
8. Montravers P, Lepape A, Dubreuil L et al (2009) Clinical and microbiological profiles of community-acquired and nosocomial intra-abdominal infections: results of the French prospective, observational EBIA study. *J Antimicrob Chemother* 63:785–794 <https://doi.org/10.1093/jac/dkp005>

#### **Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:**

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ▶ [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---

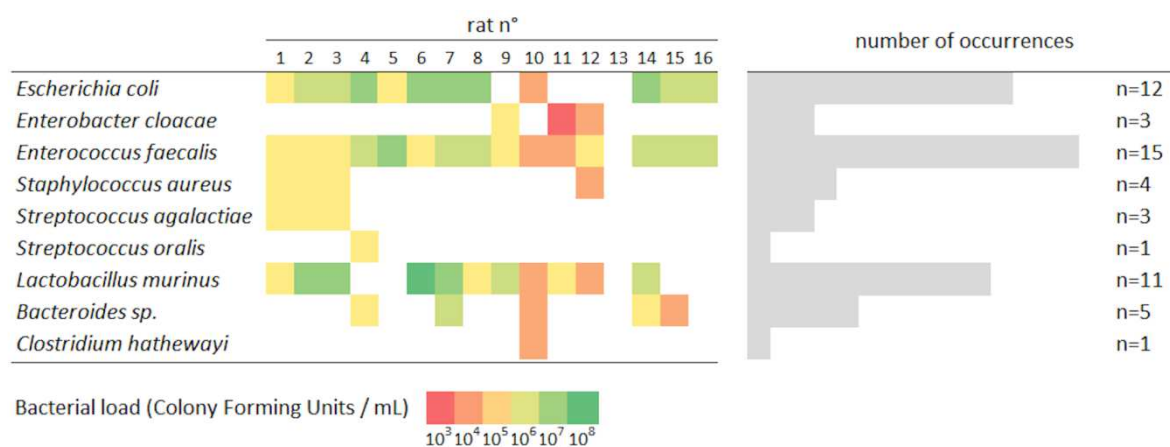


Figure S1. Peritoneal fluid culture analysis of 16 rats 16 hours after CLP

Suppl Table1. Probabilistic antimicrobial therapy used in rat CLP models in the literature published in 2018 and 2019

Author Year	Treatment, dose	Route of administration	Duration	Objective
Assis MS <sup>1</sup> 2018	gentamycin 3 mg/kg + clindamycin 25 mg/kg	IP	72 hours (dose per day not specified)	Effects of caffeine on behavioural and cognitive deficits in rats
Bedirli N <sup>2</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg + clindamycin 25 mg/kg	IP	every 6 hours for 72 h	To compare the effects of sevoflurane and isoflurane on systemic inflammation
Choi M <sup>3</sup> 2018	moxifloxacin 3 mg/kg	Non specified	Single dose after surgery	Effect of hypobaria and hyperoxia during sepsis on survival and energy metabolism
Danielski LG <sup>4</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	immediately after and 12 hours after CLP	Effect of vit B6 on the Kynurenine pathway, acute neurochemical and neuroinflammatory parameters, and cognitive dysfunction
Della Giustina A <sup>5</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	immediately after and 12 hours after CLP	Determine the effect of a fish oil (FO)-55-enriched lipid emulsion as an important anti-inflammatory compound on brain dysfunction
Gasparotto J <sup>6</sup> 2018	Ceftriaxone 30 mg/kg et clindamycin 25 mg/kg	SC	every 6 hours for 72 hours	Determine role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuroinflammation, neurodegeneration-associated changes, and cognitive dysfunction arising after sepsis recovery
Giustina AD <sup>7</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	immediately after and 12 hours after CLP	Evaluate the effect of DMF (dimethyl fumarate) in different organs of rats submitted to an animal model of sepsis

Wang P <sup>8</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	every 6 hours for 72 hours	Investigate mechanisms and molecular pathways of neuroprotective effects of Omi/HtrA2 inhibition
Wang Y <sup>9</sup> 2018	imipenem/cilastatin 14 mg/kg	IP	Single dose at 6 hours after surgery	Determine whether resveratrol alleviates pediatric AKI and investigated the potential mechanism
Yang J <sup>10</sup> 2018	imipenem 120mg/kg	IP	Single dose	Effect of combination treatment of the sepsis bundle with cyclophosphamide would improve the function of the intestinal mucosa and enhance survival in rats with induced sepsis
Zarbato GF <sup>11</sup> 2018	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	immediately after and 12 hours after CLP	Dimethyl Fumarate Limits Neuroinflammation and Oxidative Stress and Improves Cognitive Impairment after Polymicrobial Sepsis
Capcha JMC <sup>12</sup> 2019	imipenem/cilastatin 14 mg/kg	SC	Single dose at 6 hours after surgery	Evaluate the effects of the Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a treatment for cardiopulmonary injury, as well as on neuroimmunomodulation
Chen J <sup>13</sup> 2019	imipenem/cilastatin 25 mg/kg	IP	one time immediately after surgery	Investigate the role and possible mechanisms of exogenous melatonin to improve liver injury and glucose metabolism disturbances in the context of sepsis.
Jiang Y <sup>14</sup> 2019	imipenem 25 mg/kg	SC	one time immediately after surgery	Analyze the metabolic changes of rats' sepsis model established by cecal ligation and puncture (CLP) and evaluate therapeutic targets and mechanisms of Xuebijing on sepsis
Liverani E <sup>15</sup> 2019	imipenem/cilastatin 25 mg/kg	IP	2 times per day until euthanasia after surgery during 4 days	Investigate whether Protein kinase C-delta inhibition provided organ protection and improved survival without compromising pathogen clearance.
Manfredi A <sup>16</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	Every 6 hours during 3 days	Determine whether stimulation of mitochondrial dynamics improves mitochondrial function and long-term cognitive impairment in an experimental model of sepsis
Michels M <sup>17</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg + clindamycin 25 mg/kg	SC	Every 6 hours during 3 days	Characterize the kinetics of microglial phenotypes early and late after systemic inflammation in an animal model of severe sepsis, and the effects of minocycline on these phenotypes
Michels M <sup>18</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	Every 12 hours during 3 days	Determine the effects of microglial depletion and subsequent repopulation early during systemic and brain inflammatory response and its impact on late cognitive dysfunction in an animal model of severe sepsis
Milioli MVM <sup>19</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	Every 6 hours during 3 days	Evaluate behavioral and neurochemical parameters in adult (180-day-old) and young (60-day-old) rats subjected to sepsis
Petronilho F <sup>20</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	immediately after and 12 h after CLP	Investigate if the association of gold nanoparticles and N-acetylcysteine could prevent oxidative stress and mitochondrial and creatine kinase alterations in the brain of septic rats
Wu J <sup>21</sup> 2019	imipenem 25 mg/kg	IP	twice a day for 3 days.	Investigate the protective effects of neuregulin-1 $\beta$ (NRG-1 $\beta$ ) on sepsis-induced diaphragm atrophy and the possible underlying mechanisms

Yang Y <sup>22</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg	SC	Every 6 hours during 3 days	Investigated whether the anti-apoptotic effect of IGF-1 is associated with cytochrome C and TNFR regulation
Yang YM <sup>23</sup> 2019	imipenem 14 mg/kg	SC	Single dose at 6 hours after surgery	investigate the regulatory effect of long non-coding RNA (lncRNA) NKILA on autophagy in sepsis-induced kidney injury

IP: intraperitoneal

SC: subcutaneous

1. Assis MS, Soares AC, Sousa DN, et al (2018) Effects of Caffeine on Behavioural and Cognitive Deficits in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 123:435–442. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13036>
2. Bedirli N, Bagriacik EU, Yilmaz G, et al (2018) Sevoflurane exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and memory impairment through caspase 3/9 and Bax/Bcl signaling pathway in a rat model of sepsis. *J Int Med Res* 46:2828–2842. <https://doi.org/10.1177/0300060518773265>
3. Choi M, Tamrakar P, Schuck PF, et al (2018) Effect of hypobaria and hyperoxia during sepsis on survival and energy metabolism: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 85:S68–S76. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001909>
4. Danielski LG, Giustina AD, Goldim MP, et al (2018) Vitamin B6 Reduces Neurochemical and Long-Term Cognitive Alterations After Polymicrobial Sepsis: Involvement of the Kynurenine Pathway Modulation. *Mol Neurobiol* 55:5255–5268. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0706-0>
5. Della Giustina A, Goldim MP, Danielski LG, et al (2018) Fish oil-rich lipid emulsion modulates neuroinflammation and prevents long-term cognitive dysfunction after sepsis. *Nutrition* 110417. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.12.003>
6. Gasparotto J, Girardi CS, Somensi N, et al (2018) Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- $\beta$  accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J Biol Chem* 293:226–244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786756>
7. Giustina AD, Bonfante S, Zarbato GF, et al (2018) Dimethyl Fumarate Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Organs After Sepsis in Rats. *Inflammation* 41:315–327. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0689-z>
8. Wang P, Hu Y, Yao D, Li Y (2018) Omi/HtrA2 Regulates a Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathway in a Murine Model of Septic Encephalopathy. *Cell Physiol Biochem* 49:2163–2173. <https://doi.org/10.1159/000493819>
9. Wang Y, Feng F, Liu M, et al (2018) Resveratrol ameliorates sepsis-induced acute kidney injury in a pediatric rat model via Nrf2 signaling pathway. *Exp Ther Med* 16:3233–3240. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6533>

10. Yang J, Zhang S, Wu J, et al (2018) Imipenem and normal saline with cyclophosphamide have positive effects on the intestinal barrier in rats with sepsis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 162:90–98. <https://doi.org/10.5507/bp.2018.032>
11. Zarbato GF, de Souza Goldim MP, Giustina AD, et al (2018) Dimethyl Fumarate Limits Neuroinflammation and Oxidative Stress and Improves Cognitive Impairment After Polymicrobial Sepsis. *Neurotox Res* 34:418–430. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9900-8>
12. Capcha JMC, Rodrigues CE, Moreira R de S, et al (2019) Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells attenuate sepsis-induced organ injury partially via cholinergic anti-inflammatory pathway activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 318:R135–R147. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00098.2018>
13. Chen J, Xia H, Zhang L, et al (2019) Protective effects of melatonin on sepsis-induced liver injury and dysregulation of gluconeogenesis in rats through activating SIRT1/STAT3 pathway. *Biomed Pharmacother* 117:109150. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109150>
14. Jiang Y, Zou L, Liu S, et al (2019) GC/MS-based metabolomics approach reveals effects of Xuebijing injection in CLP induced septic rats. *Biomed Pharmacother* 117:109163. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109163>
15. Liverani E, Tursi SA, Cornwell WD, et al (2019) Protein kinase C-delta inhibition is organ-protective, enhances pathogen clearance, and improves survival in sepsis. *FASEB J* 34:2497–2510. <https://doi.org/10.1096/fj.201900897R>
16. Manfredini A, Constantino L, Pinto MC, et al (2019) Mitochondrial dysfunction is associated with long-term cognitive impairment in an animal sepsis model. *Clin Sci* 133:1993–2004. <https://doi.org/10.1042/CS20190351>
17. Michels M, Abatti MR, Ávila P, et al (2019) Characterization and modulation of microglial phenotypes in an animal model of severe sepsis. *J Cell Mol Med* 24:88–97. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14606>
18. Michels M, Ávila P, Pescador B, et al (2019) Microglial Cells Depletion Increases Inflammation and Modifies Microglial Phenotypes in an Animal Model of Severe Sepsis. *Mol Neurobiol* 56:7296–7304. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1606-2>
19. Milioli MVM, Burger H, Olivieri R, et al (2019) The impact of age on long-term behavioral and neurochemical parameters in an animal model of severe sepsis. *Neurosci Lett* 708:134339. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134339>
20. Petronilho F, Tenfen L, Della Giustina A, et al (2019) Gold nanoparticles potentiates N-acetylcysteine effects on neurochemicals alterations in rats after polymicrobial sepsis. *J Drug Target* 28:428–436. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1678168>
21. Wu J, Liu H, Chu T, et al (2019) Neuregulin-1 $\beta$  attenuates sepsis-induced diaphragm atrophy by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* 40:43–51. <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09512-2>

22. Yang Y-M, Li Y-H, Ding L-L, et al (2019) Regulatory effect of lncRNA NKILA on autophagy induced by sepsis kidney injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:8011–8017. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201909\\_19017](https://doi.org/10.26355/eurrev_201909_19017)
23. Yang Y, Liang S, Li Y, et al (2019) Effects of early administration of insulin-like growth factor-1 on cognitive function in septic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15:323–337. <https://doi.org/10.2147/NDT.S19084>

Suppl Table2. Probabilistic antimicrobial therapy used in mouse CLP models in the literature published in 2018 and 2019

Author	Treatment, dose	Route of administration	Duration	Objective
Al Zoubi S <sup>1</sup> 2018	imipenem/cilastatin, 20 mg/kg	SC	6 and 18 h after CLP	Hypothesize that type 2 diabetes (T2DM) augments the cardiac (organ) dysfunction associated with sepsis, and that inhibition of the NF-κB pathway with linagliptin attenuates the cardiac (organ) dysfunction in mice with T2DM/sepsis.
Arimoto A <sup>2</sup> 2018	Meropenem (Dose not specified)	IP	Every 12 h for 3 days	Hypothesize that peritonitis induces immunosuppression in the lung, which in turn promotes lung metastasis
Ayalon I <sup>3</sup> 2018	Imipenem 25 mg/kg	IP	Single dose	Hypothesize that sepsis induces browning of the WAT (white adipose tissue) but obesity alters this adipose tissue response during sepsis.
Busch D <sup>4</sup> 2018	Imipenem 25 mg/kg	SC	Every 12 h until d 5	Hypothesize that the PPAR-β/δ-agonist GW0742 improves long-term outcome after sepsis
Castanheira FVES <sup>5</sup> 2018	Ertapenem 20 mg/kg	IP	Beginning 6 h after CLP and then every 12 h up to day 3.	Hypothesize that ACKR2 could contribute to the degradation of chemokines in the foci of infection or in the vital organs, leading, in the first case, to aggravation of sepsis
Chen G <sup>6</sup> 2018	combination of vancomycin (1 g/L), kanamycin (1 g/L), ampicillin (1 g/L), and metronidazole (1 g/L) in their drinking water	PO	2 months	Investigate the function of GPR109A in more detail, our study used cecum ligation and puncture surgery (CLP), described as the “gold standard” model for sepsis (26), to examine the effects of Gpr109a deletion.
de Souza Gomes R <sup>7</sup> 2018	ceftriaxone 20 mg/kg	IP	24 h before and at time zero of CLP induction	Investigate the effect of pretreatment with salivary gland extract (SGE) from <i>Ae. aegypti</i> in the induction of inflammatory and oxidative processes
Drechsler S <sup>8</sup> 2018	Imipenem 25 mg/kg	SC	Twice daily for five consecutive days post-CLP	Investigate the effects of splenectomy as an added traumatic insult in a 2-hit mouse model of polytrauma (hemorrhagic shock with femur



				fracture) followed by abdominal sepsis after 48 hours
Fay KT <sup>9</sup> 2018	ceftriaxone 25mg/kg + metronidazole 12.5mg/kg	SC	12h dosing schedule for 48 hours postoperatively.	utilize a CD43 <sup>-/-</sup> model to further understand the impact of CD43 and the immunological derangements that occur in the senescent phase of sepsis.
Ferreira RG <sup>10</sup> 2018	Ertapenem 20 mg/kg	IP	Beginning 6 h after CLP and then every 12 h up to day 3.	Investigate the role of Gal-3 in sepsis outcome.
Gao R <sup>11</sup> 2018	Ertapenem 20 mg/kg	IP	Once daily for a total of 3 days	$\beta$ 2-microglobulin in the brain also mediates sepsis-induced cognitive impairment.
Guo L <sup>12</sup> 2018	ceftriaxone 50 mg/kg + Meronidal 50 mg/kg	IP	Every 12 h for 2 days	Explore the protective effects and understand the underlying mechanisms for the beneficial effects of live combined <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> (LCBE) in cecal ligation puncture (CLP)-induced sepsis.
Hu YM <sup>13</sup> 2018	Ertapenem 75 mg/kg	IP	Single dose 6 hours after surgery	Investigate glutamine effects on regulating leukocyte programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (programmed cell death ligand 1 [PD-L1]) expression, macrophage function, inflammation, and acute kidney injury in sepsis.
Hu ZQ <sup>14</sup> 2018	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	6 hours after surgery and continuing every 12 h for 2 days	In the present study, a two-hit model which mimics clinical conditions was used and the potential role of Tregs in secondary <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection post-sepsis was investigated
Ji M <sup>15</sup> 2018	Ertapenem 20 mg/kg	SC	Immediately after operation	Hypothesize that p75NTR signaling might contribute to synaptic and cognitive impairments associated with sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP).
Ji MH <sup>16</sup> 2018	Ertapenem 20 mg/kg	SC	Single dose immediately after operation	Investigate the impact of Mycophenolate mofetil on programmed death-1 expression within immune cells and its role in sepsis.
Jorge LB <sup>17</sup> 2018	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	6 hours and 18 hours after surgery	Analyze the role of Klotho in sepsis-induced AKI and multiple organ dysfunction
Karpurapu M <sup>18</sup> 2018	Imipenem monohydrate supplemented water	PO	During 96h	Identify a novel role for Nuclear Factors of Activated T cells (NFATc3) in the regulation of inflammatory genes produced by macrophages during murine sepsis-induced ALI
MacMillan- Crow LA <sup>19</sup> 2018	Imipenem/cilastatin, 14 mg/kg	SC	6 hours and 18 hours after surgery	Investigate possible gender differences in renal mitochondrial function and dynamic
Matsuo S <sup>20</sup> 2018	Imipenem/cilastatin 0,5 mg/kg;	SC	Single dose after CLP	Hypothesize that administration of PYR-41, an inhibitor of ubiquitination, could reduce inflammation and organ injury in septic mice
Medeiros- de-Moraes IM <sup>21</sup> 2018	imipenem 10 mg/kg	IP	Single dose 6 hours after surgery	Analyze the effect of omega-9 supplementation on corticosteroid unbalance, inflammation, bacterial elimination, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma



				expression, an omega-9 receptor and inflammatory modulator
Neves FS <sup>22</sup> 2018	Ceftriaxone 30 mg/kg + clindamycin 25 mg/kg	SC	Every 12 h for 3 days	Hypothesize that inhibition of brain insulin signaling might be associated with cognitive impairment observed in sepsis survivors
Ode Y <sup>23</sup> 2018	Imipenem 0,5 µg/kg	SC	Single dose	Hypothesize that CIRP induces ICAM-1 expression in neutrophils causing injury to the lungs during sepsis
Panpetch W <sup>24</sup> 2018	imipenem/cilastatin, 14 mg/kg	SC	Single dose 6 hours after surgery	Investigate that intestinal colonization with <i>C. albicans</i> enhances bacterial sepsis severity through the gut translocation of BG in the absence of candidemia and those intestinal fungi suppression, by fluconazole, attenuates serum BG, mortality, and severity of inflammation as judged by serum IL-6.
Patel A <sup>25</sup> 2018	Azithromycin 100 mg/kg i.p. + ceftriaxone 100 mg/kg	IP SC	Single dose administered 3 h after CLP	Evaluate azithromycin benefit in the murine cecal ligation and puncture (CLP) model of polymicrobial sepsis.
Rana M <sup>26</sup> 2018	imipenem/cilastatin, 0.5 mg/kg	SC	Single dose after CLP	hypothesize that altered vagus nerve activity contributes to immune impairment in sepsis survivors
Steeland S <sup>27</sup> 2018	Ceftriaxone 25 mg/kg + metronidazole 12.5 mg/kg	SC	9 and 24 h after CLP	Investigate plasma levels of both matrix metalloproteinase 8 and tumor necrosis factor receptor 1 are associated with sepsis severity and also investigates the therapeutic applicability of simultaneous inhibition of the two molecules in sepsis.
Taratummar at S <sup>28</sup> 2018	Imipenem/cilastatin 14 mg/kg	SC	Post-operation and at 6 h later.	Test if the administration of gold nanoparticle, as an adjuvant to antibiotics, could attenuate bacterial sepsis
Xie J <sup>29</sup> 2018	Ceftriaxone 25mg/kg + metronidazole 12.5mg/kg	SC	Single dose after CLP	Hypothesize that the presence of pre-existing malignancy would result in phenotypic and functional changes in CD4+ T cell responses following sepsis
Xie Z <sup>30</sup> 2018	Amoxicillin 10mg/kg	IP	Single dose after CLP	Demonstrated the role of Wfdc21 in sepsis progression using a CLP-induced animal model and a cell-based mode
Xu H <sup>31</sup> 2018	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	Every 12 h starting 2 h after CLP during 7 days	Test the hypothesis that IL-33 is a regulator of lung inflammation in the early phases of sepsis. Using a model of polymicrobial intra-abdominal sepsis, we showed that IL-33 plays a central role in inducing lung injury within hours after the onset of severe sepsis.
Zhang H <sup>32</sup> 2018	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	8 and 16 h after CLP	Evaluate the immunological effect of miR-23b on NF-κB activity and the apoptotic signaling pathway.

Zhang H <sup>33</sup> 2018	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	8 and 16 h after CLP	Hypothesize that the induction of miR-23b in polymicrobial sepsis might emerge as a modifier to regulate fibrotic remodeling in the heart.
Zhou M <sup>34</sup> 2018	Imipenem/cilastatin, 0.5 mg/kg	SC	Single dose after CLP	Investigate the role of ghrelin for promoting the proliferation of CD4 T cells after sepsis
Zhou Y <sup>35</sup> 2018	Imipenem 25 mg/kg	SC	At 6, 24, and 48 h after CLP	Hypothesize that EPCs protect the microvasculature through the exosomes-mediated transfer of microRNAs (miRNAs).
Ballegeer M <sup>36</sup> 2019	Ceftriaxone 25 mg/kg and metronidazole 12.5 mg/kg.	IP	10 and 24 h after CLP onset	investigated the role of GILZ in sepsis
Barter J <sup>37</sup> 2019	Imipenem 25 mg/kg	SC	Starting 8 h after CLP an twice a day thereafter for a total of 2 doses in the mice sacrificed on postoperative day (POD) and 6 doses in mice sacrificed on POD4	determine how advanced age and sex influence the hippocampal transcriptome
Chen W <sup>38</sup> 2019	Imipenem/cilastatin 0.5 mg/mouse	SC	Single 30 min post CLP	Evaluate the effect of analgesics on sepsis-induced systemic inflammation
Das P <sup>39</sup> 2019	Imipenem a) 5 mg/kg b) 25 mg/kg	SC	a) 30 min after procedure (1 dose) to 10–12-week old mice b) to 16–18-month-old mice every 12 h for 7 days	Investigate if Novel Chitohexaose Analog Protects Young and Aged mice from CLP Induced Polymicrobial Sepsis
Ding X <sup>40</sup> 2019	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	Single dose after surgery	Hypothesize that Mechanical ventilation could exacerbate CLP-mediated lung injury through IL-33 and speculate that ventilation mode would correlate with IL-33 upregulation
Gong W <sup>41</sup> 2019	Ertapenem 75 mg/kg	IP	6 h after surgery and reinjected every 24 h until day 3 post-surgery.	Use effective experimental models that faithfully replicate what occurs in patients with sepsis
Hoffman M <sup>42</sup> 2019	Ertapenem 70 mg/kg	IP	2 hours after CLP and every 24 hours during 5 days	Investigate the course of cardiac dysfunction and myocardial load in different mouse models of sepsis to identify the optimal measurements for early systolic and diastolic dysfunction.
Hu Q <sup>43</sup> 2019	Imipenem-cilastatin 25 mg/kg	SC	3 hours post-CLP	Hypothesize that STING is involved in the pathogenesis of sepsis by mediating IEC apoptosis induced by increased intestinal inflammation
Jones Buie JN <sup>44</sup> 2019	Imipenem 25 mg/kg,	SC	6, 24, and 48 hours after CLP.	Hypothesize that cationic DEAC-pGlcNAc would form nanoparticles with miRNAs and thereby would successfully deliver active miRNA-126 with minimal toxicity and improve sepsis survival
Kitzmiller L <sup>45</sup> 2019	Imipenem group 25 mg/kg	IP	1 h and every 24 h after the CLP procedure up to 72 h.	Investigate the effect of pharmacological activation of AMPK with A769662 on lung injury by using a model that would preferably mimic the clinical condition of adult patients

Kokkinaki D <sup>46</sup> 2019	Ertapenem 70 mg/kg	SC	6 h after CLP and subsequently every 24 h for three days	Evaluated the therapeutic potential of the mammalian lignan precursor secoisolariciresinol diglucoside
Laroye C <sup>47</sup> 2019	Imipenem 50 µg/g	SC	Every 12 h for 7 days	hypothesize that MSC properties may vary depending on their tissue source in the setting of sepsis
Lyons JD <sup>48</sup> 2019	Ceftriaxone 50 mg/kg + metronidazole 35 mg/kg	SC	12, 24, and 36 hours after surgery.	Determine the relative importance of pre-existing comorbidity and type of sepsis on the physiologic abnormalities induced by the combination of cancer and sepsis.
Mai C <sup>49</sup> 2019	Clindamycin (150 mg/kg + ceftriaxone 50 mg/kg	IP	Every 6 hours during 96h	Investigate the role of long non-coding RNA Lethe in mediating autophagy of cortical neurons in mice with sepsis-induced brain injury
Mei S <sup>50</sup> 2019	Imipenem and cilastatin;	SC	14 mg/kg at 6 h and 7 mg/kg at 18 h after surgery	Prove whether mechanical ventilation with conventional tidal volume would aggravate multi-organ injuries induced by sepsis
Mella JR <sup>51</sup> 2019	Imipenem 25 mg/kg	SC	Beginning 2 hours after CLP and continued every 12 hours for a total of 6 doses	Hypothesize that NK-1R activation would contribute to the morbidity and mortality of sepsis in a model using mice genetically deficient in the NK-1R.
Naito Y <sup>52</sup> 2019	Imipenem/cilastatin	IP	14 mg/kg 6 h after CLP AND repeated with 7 mg/kg every 12 h for 4 days	Identify candidate downstream factors of the TLR9 pathway that led to septic acute kidney injury
O'Riordan <sup>53</sup> 2019	Imipenem/cilastatin 20 mg/kg in saline	SC	6 and 18 h after surgery	Investigate whether pharmacological inhibition of BTK (ibrutinib 30 mg/kg and acalabrutinib 3 mg/kg) attenuates sepsis associated cardiac dysfunction in mice
Pang D <sup>54</sup> 2019	Enrofloxacin 5 mg/kg	SC	Twice daily during 4 days of the study	Examine the time course and location of early microglial activation and its anatomic relationship to the development of acute cerebral edema
Pereira PAT <sup>55</sup> 2019	Ertapenem, 75 mg/kg	IP	Beginning at 3 h after surgery and re-injected every 24 h until day 3 after surgery	Investigate survival outcomes, and immunological and metabolomic effects of hyaluronidase
Seymour CW <sup>56</sup> 2019	Imipenem/cilastatin 25 mg/kg	IP	Single dose immediately or 2h or 4h after physiological deterioration	Determine phenotypes of polymicrobial sepsis prior to physiologic deterioration, and the association between phenotypes and outcome in a randomized trial of prompt or delayed antibiotics and fluids.
Silva JF <sup>57</sup> 2019	Ertapenem 30 mg/kg	SC	1 h after CLP and every 12 h, for 3 days	Investigate whether O-GlcNAc affects the inflammatory response and cardiovascular dysfunction associated with sepsis
Skirecki T <sup>58</sup> 2019	Imipenem 25 mg/kg,	SC	From 2 h post-CLP Twice daily (approximately every 12 h) for 5 consecutive days post-CLP.	Evaluate the early outcome-dependent immuno-inflammatory response in humanized mice
Umakoshi K <sup>59</sup> 2019	Meropenem 100 mg/kg	SC	3 h after CLP and the subsequent every 12 h during 7 days	investigate kinetic changes in the immune responses
Vandewalle J <sup>60</sup> 2019	Ceftriaxone (25 mg/kg + metronidazole 12.5 mg/kg	IP	Ten and 24 h after CLP	Hypothesize that TNF has a dual role in sepsis, namely a mediating and a protective role, and that protection might be obtained by TNFR1-specific inhibition.

Vu CTB <sup>61</sup> 2019	imipeneme- cilastatine 10mg/kg	IV	Immediately after the operation, and at 6 h and 24 h later.	Determine kinetic changes in the immune phenotype by determining the proportion of T cells, B cells and macrophages, and especially the expression of an immune exhaustion marker PD
Zhang Z <sup>62</sup> 2019	ceftriaxone 30 mg/kg + clindamycin 25 mg/kg	SC	Every 12 h for a total of 3 days	Probenecid administration CAN inhibit PANX1- mediated release of cellular ATP and ameliorate cognitive impairment

IP: intraperitoneal; IV: intravenous SC: subcutaneous; PO: per os

1. Al Zoubi S, Chen J, Murphy C, et al (2018) Linagliptin Attenuates the Cardiac Dysfunction Associated With Experimental Sepsis in Mice With Pre-existing Type 2 Diabetes by Inhibiting NF- $\kappa$ B. *Front Immunol* 9:2996. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02996>
2. Arimoto A, Yamashita K, Hasegawa H, et al (2018) Immunosuppression Induced by Perioperative Peritonitis Promotes Lung Metastasis. *Anticancer Res* 38:4333–4338. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12733>
3. Ayalon I, Shen H, Williamson L, et al (2018) Sepsis Induces Adipose Tissue Browning in Nonobese Mice But Not in Obese Mice. *Shock* 50:557–564. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001076>
4. Busch D, Kapoor A, Rademann P, et al (2018) Delayed activation of PPAR- $\beta/\delta$  improves long-term survival in mouse sepsis: effects on organ inflammation and coagulation. *Innate Immun* 24:262–273. <https://doi.org/10.1177/1753425918771748>
5. Castanheira FVES, Borges V, Sônego F, et al (2018) The Atypical Chemokine Receptor ACKR2 is Protective Against Sepsis. *Shock* 49:682–689. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000969>
6. Chen G, Huang B, Fu S, et al (2018) G Protein-Coupled Receptor 109A and Host Microbiota Modulate Intestinal Epithelial Integrity During Sepsis. *Front Immunol* 9:2079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02079>
7. de Souza Gomes R, Navegantes-Lima KC, Monteiro VVS, et al (2018) Salivary Gland Extract from *Aedes aegypti* Improves Survival in Murine Polymicrobial Sepsis through Oxidative Mechanisms. *Cells* 7:. <https://doi.org/10.3390/cells7110182>
8. Drechsler S, Zipperle J, Rademann P, et al (2018) Splenectomy modulates early immunoinflammatory responses to trauma-hemorrhage and protects mice against secondary sepsis. *Sci Rep* 8:14890. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33232-1>
9. Fay KT, Chihade DB, Chen C-W, et al (2018) Increased mortality in CD43-deficient mice during sepsis. *PLoS ONE* 13:e0202656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202656>
10. Ferreira RG, Rodrigues LC, Nascimento DC, et al (2018) Galectin-3 aggravates experimental polymicrobial sepsis by impairing neutrophil recruitment to the infectious focus. *J Infect* 77:391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.010>

11. Gao R, Li G, Yang R, et al (2018) Hippocampal  $\beta$ 2-microglobulin mediates sepsis-induced cognitive impairment. *Mol Med Rep* 17:7813–7820. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8858>
12. Guo L, Meng M, Wei Y, et al (2018) Protective Effects of Live Combined *B. subtilis* and *E. faecium* in Polymicrobial Sepsis Through Modulating Activation and Transformation of Macrophages and Mast Cells. *Front Pharmacol* 9:1506. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01506>
13. Hu Y-M, Hsiung Y-C, Pai M-H, Yeh S-L (2018) Glutamine Administration in Early or Late Septic Phase Downregulates Lymphocyte PD-1/PD-L1 Expression and the Inflammatory Response in Mice With Polymicrobial Sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 42:538–549. <https://doi.org/10.1177/0148607117695245>
14. Hu Z-Q, Yao Y-M, Chen W, et al (2018) Partial Depletion of Regulatory T Cells Enhances Host Inflammatory Response Against Acute *Pseudomonas aeruginosa* Infection After Sepsis. *Inflammation* 41:1780–1790. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0821-8>
15. Ji M, Yuan H, Yuan S, et al (2018) The p75 neurotrophin receptor might mediate sepsis-induced synaptic and cognitive impairments. *Behav Brain Res* 347:339–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.042>
16. Ji M-H, Xia D-G, Zhu L-Y, et al (2018) Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Inflammation* 41:515–529. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0708-0>
17. Jorge LB, Coelho FO, Sanches TR, et al (2019) Klotho deficiency aggravates sepsis-related multiple organ dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol* 316:F438–F448. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00625.2017>
18. Karpurapu M, Lee YG, Qian Z, et al (2018) Inhibition of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 activation attenuates acute lung injury and pulmonary edema in murine models of sepsis. *Oncotarget* 9:10606–10620. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24320>
19. MacMillan-Crow LA, Mayeux PR (2018) Female mice exhibit less renal mitochondrial injury but greater mortality using a comorbid model of experimental sepsis. *Intern Med Rev (Wash D C)* 4:. <https://doi.org/10.18103/imr.v4i10.768>
20. Matsuo S, Sharma A, Wang P, Yang W-L (2018) PYR-41, A Ubiquitin-Activating Enzyme E1 Inhibitor, Attenuates Lung Injury in Sepsis. *Shock* 49:442–450. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000931>
21. Medeiros-de-Moraes IM, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Kurz ARM, et al (2018) Omega-9 Oleic Acid, the Main Compound of Olive Oil, Mitigates Inflammation during Experimental Sepsis. *Oxid Med Cell Longev* 2018:6053492. <https://doi.org/10.1155/2018/6053492>

22. Neves FS, Marques PT, Barros-Aragão F, et al (2018) Brain-Defective Insulin Signaling Is Associated to Late Cognitive Impairment in Post-Septic Mice. *Mol Neurobiol* 55:435–444. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0307-3>
23. Ode Y, Aziz M, Wang P (2018) CIRP increases ICAM-1+ phenotype of neutrophils exhibiting elevated iNOS and NETs in sepsis. *J Leukoc Biol* 103:693–707. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0817-327RR>
24. Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, et al (2018) Gastrointestinal Colonization of *Candida Albicans* Increases Serum (1→3)-β-D-Glucan, without Candidemia, and Worsens Cecal Ligation and Puncture Sepsis in Murine Model. *Shock* 49:62–70. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000896>
25. Patel A, Joseph J, Periasamy H, Mokale S (2018) Azithromycin in Combination with Ceftriaxone Reduces Systemic Inflammation and Provides Survival Benefit in a Murine Model of Polymicrobial Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 62:. <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-18>
26. Rana M, Fei-Bloom Y, Son M, et al (2018) Constitutive Vagus Nerve Activation Modulates Immune Suppression in Sepsis Survivors. *Front Immunol* 9:2032. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02032>
27. Steeland S, Van Ryckeghem S, Vandewalle J, et al (2018) Simultaneous Inhibition of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and Matrix Metalloproteinase 8 Completely Protects Against Acute Inflammation and Sepsis. *Crit Care Med* 46:e67–e75. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002813>
28. Taratummarat S, Sangphech N, Vu CTB, et al (2018) Gold nanoparticles attenuates bacterial sepsis in cecal ligation and puncture mouse model through the induction of M2 macrophage polarization. *BMC Microbiol* 18:85. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1227-3>
29. Xie J, Robertson JM, Chen C-W, et al (2018) Pre-existing malignancy results in increased prevalence of distinct populations of CD4+ T cells during sepsis. *PLoS ONE* 13:e0191065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191065>
30. Xie Z, Guo Z, Liu J (2018) Whey Acidic Protein/Four-Disulfide Core Domain 21 Regulate Sepsis Pathogenesis in a Mouse Model and a Macrophage Cell Line via the Stat3/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signaling Pathway. *Med Sci Monit* 24:4054–4063. <https://doi.org/10.12659/MSM.907176>
31. Xu H, Xu J, Xu L, et al (2018) Interleukin-33 contributes to ILC2 activation and early inflammation-associated lung injury during abdominal sepsis. *Immunol Cell Biol* 96:935–947. <https://doi.org/10.1111/imcb.12159>
32. Zhang H, Caudle Y, Shaikh A, et al (2018) Inhibition of microRNA-23b prevents polymicrobial sepsis-induced cardiac dysfunction by modulating TGIF1 and PTEN. *Biomed Pharmacother* 103:869–878. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.092>

33. Zhang H, Li H, Shaikh A, et al (2018) Inhibition of MicroRNA-23b Attenuates Immunosuppression During Late Sepsis Through NIK, TRAF1, and XIAP. *J Infect Dis* 218:300–311. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy116>
34. Zhou M, Aziz M, Ochani M, et al (2018) The protective role of human ghrelin in sepsis: Restoration of CD4 T cell proliferation. *PLoS ONE* 13:e0201139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201139>
35. Zhou Y, Li P, Goodwin AJ, et al (2018) Exosomes from Endothelial Progenitor Cells Improve the Outcome of a Murine Model of Sepsis. *Mol Ther* 26:1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.020>
36. Ballegeer M, Vandewalle J, Eggermont M, et al (2019) Overexpression of Gilz Protects Mice Against Lethal Septic Peritonitis. *Shock* 52:208–214. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001252>
37. Barter J, Kumar A, Stortz JA, et al (2019) Age and Sex Influence the Hippocampal Response and Recovery Following Sepsis. *Mol Neurobiol* 56:8557–8572. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01681-y>
38. Chen W, Brenner M, Aziz M, et al (2019) Buprenorphine Markedly Elevates a Panel of Surrogate Markers in a Murine Model of Sepsis. *Shock* 52:550–553. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001361>
39. Das P, Panda SK, Agarwal B, et al (2019) Novel Chitohexaose Analog Protects Young and Aged mice from CLP Induced Polymicrobial Sepsis. *Sci Rep* 9:2904. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38731-3>
40. Ding X, Jin S, Shao Z, et al (2019) The IL-33-ST2 Pathway Contributes to Ventilator-Induced Lung Injury in Septic Mice in a Tidal Volume-Dependent Manner. *Shock* 52:e1–e11. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001260>
41. Gong W, Wen H (2019) Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. *Methods Mol Biol* 1960:249–255. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9167-9\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9167-9_22)
42. Hoffman M, Kyriazis ID, Lucchese AM, et al (2019) Myocardial Strain and Cardiac Output are Preferable Measurements for Cardiac Dysfunction and Can Predict Mortality in Septic Mice. *J Am Heart Assoc* 8:e012260. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012260>
43. Hu Q, Ren H, Li G, et al (2019) STING-mediated intestinal barrier dysfunction contributes to lethal sepsis. *EBioMedicine* 41:497–508. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.055>
44. Jones Buie JN, Zhou Y, Goodwin AJ, et al (2019) Application of Deacetylated Poly-N-Acetyl Glucosamine Nanoparticles for the Delivery of miR-126 for the Treatment of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. *Inflammation* 42:170–184. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0882-8>

45. Kitzmiller L, Ledford JR, Hake PW, et al (2019) Activation of AMP-Activated Protein Kinase by A769662 Ameliorates Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Adult Mice. *Shock* 52:540–549. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001303>
46. Kokkinaki D, Hoffman M, Kalliora C, et al (2019) Chemically synthesized Secoisolariciresinol diglucoside (LGM2605) improves mitochondrial function in cardiac myocytes and alleviates septic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 127:232–245. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.12.016>
47. Laroye C, Boufenzer A, Jolly L, et al (2019) Bone marrow vs Wharton’s jelly mesenchymal stem cells in experimental sepsis: a comparative study. *Stem Cell Res Ther* 10:192. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1295-9>
48. Lyons JD, Chen C-W, Liang Z, et al (2019) Murine Pancreatic Cancer Alters T Cell Activation and Apoptosis and Worsens Survival After Cecal Ligation and Puncture. *Shock* 51:731–739. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001203>
49. Mai C, Qiu L, Zeng Y, Jian H-G (2019) LncRNA Lethe protects sepsis-induced brain injury via regulating autophagy of cortical neurons. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:4858–4864. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201906\\_18073](https://doi.org/10.26355/eurrev_201906_18073)
50. Mei S, Wang S, Jin S, et al (2019) Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Attenuate the Multiple Organ Injuries Induced by Sepsis and Mechanical Ventilation in Mice. *Inflammation* 42:485–495. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0905-5>
51. Mella JR, Stucchi AF, Duffy ER, Remick DG (2019) Neurokinin-1 Receptor Deficiency Improves Survival in Murine Polymicrobial Sepsis Through Multiple Mechanisms in Aged Mice. *Shock* 52:61–66. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001248>
52. Naito Y, Tsuji T, Nagata S, et al (2020) IL-17A activated by Toll-like receptor 9 contributes to the development of septic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 318:F238–F247. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00313.2019>
53. O’Riordan CE, Purvis GSD, Collotta D, et al (2019) Bruton’s Tyrosine Kinase Inhibition Attenuates the Cardiac Dysfunction Caused by Cecal Ligation and Puncture in Mice. *Front Immunol* 10:2129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02129>
54. Pang D, Wu YL, Alcamo AM, et al (2019) Early Axonal Injury and Delayed Cytotoxic Cerebral Edema are Associated With Microglial Activation in a Mouse Model of Sepsis. *Shock*. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001446>
55. Pereira PAT, Bitencourt CS, Reis MB, et al (2020) Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *Inflamm Res* 69:105–113. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01297-x>
56. Seymour CW, Kerti SJ, Lewis AJ, et al (2019) Murine sepsis phenotypes and differential treatment effects in a randomized trial of prompt antibiotics and fluids. *Crit Care* 23:384. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2655-7>



57. Silva JF, Olivon VC, Mestriner FLAC, et al (2019) Acute Increase in O-GlcNAc Improves Survival in Mice With LPS-Induced Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Front Physiol* 10:1614. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01614>
58. Skirecki T, Drechsler S, Hoser G, et al (2019) The Fluctuations of Leukocytes and Circulating Cytokines in Septic Humanized Mice Vary With Outcome. *Front Immunol* 10:1427. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01427>
59. Umakoshi K, Choudhury ME, Nishioka R, et al (2020) B lymphocytopenia and Bregs in a not-to-die murine sepsis model. *Biochem Biophys Res Commun* 523:202–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.041>
60. Vandewalle J, Steeland S, Van Ryckeghem S, et al (2019) A Study of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis in Tissue-Specific Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Deficient Mice. *Front Immunol* 10:2574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02574>
61. Vu CTB, Thammahong A, Leelahavanichkul A, Ritprajak P (2019) Alteration of macrophage immune phenotype in a murine sepsis model is associated with susceptibility to secondary fungal infection. *Asian Pac J Allergy Immunol*. <https://doi.org/10.12932/AP-170519-0565>
62. Zhang Z, Lei Y, Yan C, et al (2019) Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation* 42:1082–1092. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00969-4>

## 4. Discussion

Mon analyse de la littérature a montré que les antibiotiques étaient administrés dans seulement 15 à 18% des modèles expérimentaux de sepsis induit par LPC. A ce jour, aucune étude n'avait réalisé de documentation bactériologique au préalable, or cette documentation est indispensable pour un traitement antibiotique adapté au modèle. En effet, les études expérimentales devraient utiliser une antibiothérapie pour la réanimation des animaux en état de choc septique pour une meilleure pertinence et translation aux études humaines.

Notre modèle murin était compatible avec les patients en phase aiguë d'un choc septique pour ce qui est de la gravité (pression artérielle moyenne < 65 mmHg) et de la présentation clinique (290). Comme dans notre modèle expérimental, les infections polymicrobiennes sont

fréquentes dans la péritonite stercorale chez l'Homme avec un profil microbien similaire (Entérobactérie et Entérocoque) (291).

L'imipénème semble être l'antibiotique le plus adapté dans notre modèle. Néanmoins, il n'est pas recommandé d'utiliser les céphalosporines de troisième génération pour les animaux, afin de prévenir la résistance aux antibiotiques. Nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) des trois principales bactéries (*E. coli*, *E. cloacae*, *E. faecalis*) afin de proposer une alternative à l'imipénème. Selon nos résultats (Tableau 2), le cotrimoxazole ou la lévofloxacine pourraient être utilisés pour de futures expérimentations. Le moment de l'administration doit être compatible avec la pratique clinique c'est-à-dire au moment où le patient est symptomatique. Ainsi l'administration prophylactique devra être évitée pour mimer au mieux une prise en charge clinique chez l'Homme.

Dans notre modèle de LPC, nous pouvons observer une discordance de quantification des différentes espèces bactériennes entre les compartiments sanguin et péritonéal. En effet, *Enterobacter cloacae* est plus fréquemment représenté dans les hémocultures que dans le compartiment péritonéal (Table 1 et Figure S1). Ceci alors que le péritoine est la porte d'entrée unique de notre modèle. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de pseudomembranes dans le péritoine. En effet, la présence de cloisons pourrait sous-estimer la diversité bactérienne au niveau du péritoine, lors de la ponction réalisée pour la mise en culture bactérienne. La réalisation de prélèvements multiples permettrait probablement d'évaluer cette hypothèse. Une autre hypothèse reposerait sur la présence d'une quantité infra-délectable d'*E. cloacae* très virulente, présente au niveau péritonéal. Ainsi, cette très faible quantité d'*E. cloacae* serait suffisante pour une translocation sanguine et la détection dans les hémocultures. Toutefois, cette dernière hypothèse est peu probable, du fait

d'absence de détection d'*E cloacae* après enrichissement dans un milieu BHI enrichi en coamoxyclav (données expérimentales complémentaires non présentées dans la publication)

*A contrario*, *Lactobacillus murinus*, connu comme un microorganisme commensal ayant un rôle de barrière importante dans le microbiote intestinal du rat (292), présente probablement une virulence faible, du fait de sa fréquence élevée dans le liquide péritonéal (11/16) et faible dans les hémocultures (1/16).

Enfin, l'objectif de notre étude était essentiellement de documenter les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans le sang des rats de ce modèle, et de déterminer leur résistance aux antibiotiques, afin d'évaluer la concordance entre les thérapies antimicrobiennes et la microbiologie documentée dans le modèle de sepsis induit par LPC. Ces résultats obtenus par méthode culturale nous incitent à comprendre plus finement cette épidémiologie microbienne comparative entre le sang et le liquide péritonéal des rats de ce modèle. Pour aller plus loin, des méthodes de métagénomique 16S permettraient de mieux évaluer la diversité microbienne, notamment des anaérobies de croissance difficile.

En conclusion, la thérapie antimicrobienne n'est pas encore utilisée en routine dans des modèles expérimentaux de sepsis induit par LCP. Pour être optimale, la thérapie antimicrobienne devrait être adaptée à l'écologie bactérienne, administrée à dose curative. Notre étude ouvre la voie à des études ultérieures permettant une meilleure maîtrise du modèle expérimental de sepsis.

## Partie 2

Effet des vasopresseurs de la prise en charge symptomatique du sepsis sur la croissance bactérienne de *Escherichia coli*, bactérie modèle

## 1. Introduction

Le sepsis est défini par une défaillance d'organe avec un risque vital induit par une réponse inappropriée de l'hôte vis-à-vis d'une infection. Il s'agit d'un syndrome grave à l'origine de millions de décès dans le monde (3), dont la prise en charge doit être optimale et repose généralement sur une prise en charge symptomatique et étiologique.

Le choc septique est un sepsis associé à défaillance d'organe avec une défaillance vasculaire au premier plan (3). Elle est définie par une hypotension artérielle, avec une pression artérielle moyenne inférieure à 65mmHg, persistante, malgré un remplissage vasculaire adéquat et une hyperlactatémie (> 2 mmol/L). Devant ces critères, des vasopresseurs doivent être introduits afin de maintenir une pression artérielle compatible avec la physiologie (3). Les recommandations actuelles préconisent l'usage de la noradrénaline (NAD) en première intention avec, en seconde ligne, la vasopressine (10). D'autres défaillances d'organes peuvent être associées au sepsis, en particulier une défaillance cardiaque septique qui est provoquée par plusieurs voies de signalisation (33). Ces défaillances d'organe sont initiées par la reconnaissance des pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) liés aux micro-organismes et par la libération intracellulaire des damage-associated molecular patterns (DAMPs) des cellules lésées, comme les mitochondries, les protéines de choc thermique et les cytokines intracellulaires(293,294). Lors de la défaillance cardiaque liée au sepsis, l'initiation d'un traitement inotrope, telle la dobutamine, peut être nécessaire. L'adrénaline, qui a des propriétés à la fois inotropes et vasopressives, peut être utilisée comme alternative à la NAD et à la dobutamine (10).

L'usage prolongé de la noradrénaline a des effets délétères. Sur le plan vasculaire la noradrénaline provoque une diminution de la microcirculation pouvant engendrer des défaillances d'organes. Elle peut aussi engendrer une cardiomyopathie par une ischémie

occasionner par le stress oxydatif, une surcharge en calcium ou encore par une dysfonction mitochondriale (127,295). Sur le plan immunitaire (128,139), la NAD favoriserait l'état d'immunosuppression lié au sepsis, en limitant la production de cytokine pro-inflammatoire et en augmentant celle des cytokines anti- inflammatoires. L'usage d'alternatives comme la vasopressine (VASO) recommandé par la SSC (81), ou encore l'angiotensine II (AngII) semble pertinent (27). Plus récemment, des biothérapies ont été proposées telles que le Procizumab® (PCZ), un anticorps ayant pour cible thérapeutique la dipeptidyl peptidase 3 (DPP3)(296). La DPP3 est une enzyme cytosolique ubiquitaire impliquée dans le clivage de plusieurs molécules de signalisation importantes, essentielles à la régulation du tonus vasculaire, dont l'angiotensine II et l'angiotensine 1-7(297,298). Récemment, nos données montrent que le PCZ améliore le débit cardiaque, le volume d'éjection systolique, la survie et réduit le stress oxydatif dans un modèle de sepsis murin par LPC (109).

D'un point de vue microbiologique, *Escherichia coli* est une des causes les plus fréquentes de sepsis d'origine bactérienne (237). De ce fait, elle a été particulièrement étudiée, à la fois sur le plan clinique, expérimental et génétique. *E. coli* est l'espèce bactérienne aérobie prédominante du microbiote intestinal des vertébrés et est également associée aux infections intra et extra-intestinales (223,224). Les études génétiques d'*E. coli* ont mis en évidence une espèce particulièrement structurée divisée en 9 groupes phylogénétiques (223,299). Parmi ces groupes phylogénétiques, certains ont été décrits comme associés au commensalisme intestinal (A et B1) et d'autres à des pathologies extra-intestinales (B2 et D)(223). Ainsi, en cas de sepsis, le fond génétique des souches de *E. coli* est différent en fonction de la porte d'entrée, par exemple en cas de sepsis d'origine digestive ou urologique (223,300,301).

Peu d'études se sont intéressées à l'effet des agents vasopresseurs sur la physiologie des agents bactériens impliqués dans le sepsis. La noradrénaline pourrait augmenter la virulence

de certaines souches d'*E. coli*, en particulier dans des environnements pauvres en nutriments (111–114,120,302). Ces études se limitent à certaines souches modèles de *E. coli*, mais ne représentent pas la diversité de l'espèce *E. coli*. Ainsi, aucune donnée n'existe actuellement sur les effets des différents vasopresseurs sur la virulence de souches représentant la diversité de l'espèce *E. coli*. Les effets du PCZ et des autres vasopresseurs tels que la vasopressine ou l'angiotensine II sur la croissance d'*E. coli* ne sont pas connus.

L'objectif de notre étude était de comparer l'effet *in vitro* de la NAD, l'AngII, de la VASO et de PCZ sur une collection représentative de la diversité génétique de *E. coli*, dans des milieux mimant différents compartiments de l'organisme. Afin d'aller plus loin, nous avons comparé les effets microbiologiques des mêmes agents vasopresseurs sur un modèle de péritonite par ligature cœcale chez le rat.

## 2. Matériel et méthode

Au cours de ce travail, j'ai effectué toutes les étapes présentées dans cette section. Elles incluent la reconstitution des milieux, le calcul des doses, les cultures bactériennes, la réalisation des western blot, la réalisation des courbes de croissance et l'analyse statistique.

### 2.1 Exploration *in Vitro*

#### 2.1.1 Collection NILS

La collection "Natural Isolates with Low Subcultures" (NILS) a été obtenue en janvier 2013 dans deux laboratoires cliniques basés dans différents hôpitaux universitaires (Colombes et Bobigny). Les souches ont été prélevées directement chez des patients hospitalisés ou en consultation ambulatoire à partir d'antibiogrammes sur des plaques de Mueller-Hinton. Ces 82 souches n'ont été mises en culture que deux fois et n'ont pas été soumises à la stabulation

avant l'extraction de l'ADN génomique et le stockage dans du glycérol à -80°C (277). Ces souches sont représentatives de la diversité phylogénétique de l'espèce d'*E. coli*. Ici nous avons choisi un panel représentatif (tableau 8) en veillant à sélectionner les souches impliquées dans les sepsis humain (selon la classification ST Warwick 69, 73, 95, 131)

Tableau 8. Panel choisi de la collection NILS

SOUCHE	Nom simplifié	SITE	Phylogroupe	O-type	H-type	Souris	ST
NILS01	1	Selles	D1	O25	H18	10	69
NILS02	2	Selles	B1	O173	H23	0	224
NILS04	4	Selles	A0	O9	H4	0	7343
NILS05	5	Selles	E	O169	H9	0	543
NILS06	6	Selles	A1	O9	H9	0	10
NILS07	7	Selles	A1	O105	H6	10	10
NILS15	15	Selles	C	Oneg	H12	7	88
NILS18	18	Sang	D1	O17	H18	10	69
NILS19	19	Sang	B2	O25	H4	10	131
NILS20	20	Sang	B2	O81	H27	4	452
NILS35	35	Urine	A1	Oneg	H4	10	4238
NILS36	36	Urine	F	O1	H7	5	new
NILS38	38	Urine	D1	O17	H1	0	501
NILS40	40	Urine	C	Oneg	H12	0	23
NILS42	42	Urine	D2	Oneg	H30	10	38
NILS45	45	Urine	E	O137	H41	1	3018
NILS49	49	Urine	B1	O9	H11	7	58
NILS51	51	Urine	D2	O3	H1	2	132
NILS57	57	Urine	B2	O1	H7	10	95
NILS59	59	Urine	B2	O6	H1	8	73
NILS60	60	Urine	F	O33	H4	6	117
536			B2	O6	H31		
RAT			B1				

(Souche : nom de la souche dans la collection NILS ; SITE : Site de collection de la souche ; phylogroupe : groupe phylogénétique; O-type : antigène somatique O ; H-type : antigène flagellaire H ; souris : nombre de souris sur dix souris décédées en modèle animal ; ST : Sequence Type (selon le schéma Warwick)



Une souche de laboratoire, *E. coli* 536, a également été utilisée comme contrôle. Il s'agit d'une souche uropathogène appartenant au phylogroupe B2, et dont le génome est parfaitement connu. Cette souche permet de s'assurer du bon déroulement de l'expérimentation car elle a une bonne capacité de croissance et une meilleure adaptabilité à son environnement. Elle laisse aussi la possibilité d'analyses plus poussées comme la protéomique puisque son génome est connu.

Les souches de *E. coli*, issues des hémocultures de nos rats du travail exposé dans la partie 1, ont été analysées pour détermination du groupe phylogénétique par PCR Clermont(248) et appartiennent toutes au phylogroupe B1. Une souche issue d'une hémoculture du rat 4 a également été choisie de façon arbitraire pour faire partie de notre panel test.

### 2.1.2 Milieux de culture

Trois milieux de culture différents ont été utilisés, le LB, le sérum-SAPI et l'urine synthétique.

1- Le milieu de culture riche, le LB (lysogeny broth (Invitrogen™ LB Agar, powder (Lennox L agar)) est le gold standard pour la culture d'*E. coli* dans le milieu industriel depuis plus de 70 ans (303). Pour 1 litre de LB notre préparation au laboratoire était composée de 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levures et, 5 g de NaCl.

2- Le milieu stressant pour les bactéries, le sérum-SAPI

Afin de créer un milieu de type hôte (mammifères) approprié pour l'étude des effets des hormones de stress sur le système neuroendocrinien des bactéries, Lyte et Ernst (111) en 1992 ont développé le sérum-SAPI, un milieu bactériostatique très stressant qui expose les bactéries à des conditions similaires à celles qui règnent à l'intérieur d'un hôte, telles que la limitation en fer, la disponibilité limitée des nutriments et de protéines de défense

immunitaire telles que les anticorps et le complément (304). La plupart des bactéries se développent généralement difficilement dans le sérum-SAPI, ce qui le rend semblable, sur le plan environnemental, à la plupart des fluides des mammifères. Le milieu minimum SAPI-sérum est composé de 6.25 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (nitrate d'ammonium, SIGMA A9642-500G), 1.84 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium phosphate monobasique, SIGMA P5379-500G), 3.35 mM KCl (chlorure de potassium, SIGMA P3911-500G), 1.01 mM MgSO<sub>4</sub> (sulfate de magnésium, SIGMA 746452-500G) et 2.77 mM glucose (SIGMA G8270), et 10mM de tampon HEPES (SIGMA H0527). La solution est ensuite tamponnée avec de la soude (NaOH) pour obtenir un pH 7.5. Après la filtration, le mélange est complété par 30% du volume total final de sérum de bovin adulte (SIGMA B9433).

- 2- Un Milieu Urine pour mimer un compartiment urinaire a été utilisé. Pour garder l'homogénéité du milieu, nous avons opté pour de l'urine synthétique (pH 6,7; densité 1,008 BIOIVT® : Synthetic Urine)(305,306).

### 2.1.3 Vasopresseur & immunothérapie

Tableau 9. Vasopresseur du sepsis avec concentrations physiologiques et thérapeutiques

Molécules à tester (Température de conservation)	Concentration physiologique	Doses thérapeutiques	Masse molaire (g/mol)	Ordre thérapeutique en mol/L	Références
Noradrénaline Conservation -20°C SIGMA A7257-5G	150 à 800 ng.L-1 OU 1nmol/L Production endogène estimée chez l'adulte à 0.3-0.5 µg.min-1 (1.7-3.0 nmol.min-1)	0,1 à 5 µg/kg/min Soit 6 à 300µg/kg/h 0,1 à 0,2 µg/kg/min (dose choisi)	169,18	10 <sup>-6</sup>	(307–310)
Vasopressine 2-8°C forme liquide SIGMA V0377-100IU	2 à 10 pg/ml	0,01 à 0,03ui/min 1ui = 3,325 µg 0,6 à 1,8 ui/h (dose choisi)	1 084,232 g	10 <sup>-9</sup>	(311,312)
Angiotensine 2 -20°C SIGMA A9525 25MG	20 à 100 pg/mL	20 ng/kg/min IV Pour un poids de 80 kg →0,1mg/h(dose choisi)	1046.20	10 <sup>-7</sup>	(88,313–315)
Procizumab ®		0.42mg/mL			(109)

Les doses utilisées dans ce travail pour tester leurs effets sur la croissance bactérienne d'*E. coli* étaient les doses thérapeutiques, à l'exception de la noradrénaline pour laquelle nous avons utilisé la dose de références du travail princeps de Lyte et al. soit  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  (111) considérée par les auteurs comme la dose physiologique et afin d'avoir un point de comparaison pour nos expérimentations. La vasopressine et l'angiotensine II ont été aliquotées après reconstitution dans du sérum physiologique (tableau 9).

#### *2.1.4 Courbes de croissance*

Les cultures de nuit ont été réalisées à partir des souches congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol, afin d'obtenir des solutions saturées en phase stationnaire soit environ  $1.6 \times 10^8$ . Cette préculture était ensuite diluée au 1/10.000 pour le LB et au 1/200 pour les milieux urine synthétique et sérum-SAPI en microplaque 96 puits à fond plat, chaque puits étant constitué de 160  $\mu\text{L}$  de milieu de culture, 20  $\mu\text{L}$  de solution bactérienne et 20  $\mu\text{L}$  de vasopresseurs (soit une dilution au 10<sup>ème</sup>) pour un volume total de 200  $\mu\text{L}$  par puits.

Les courbes de croissance ont été réalisées par mesure automatisée de la densité optique à 600 nm (DO600), à l'aide du Tecan Infinite® 200 un spectrophotomètre de plaque, avec le logiciel Magellan™. Les mesures de DO600 ont été effectuées toutes les 5 minutes pendant 24h, à une température de  $37^{\circ}\text{C}$ , avec agitation toutes les 5 minutes pendant 60 secondes. Les souches seront donc exposées 24h aux agents vasopresseurs (figure 13).

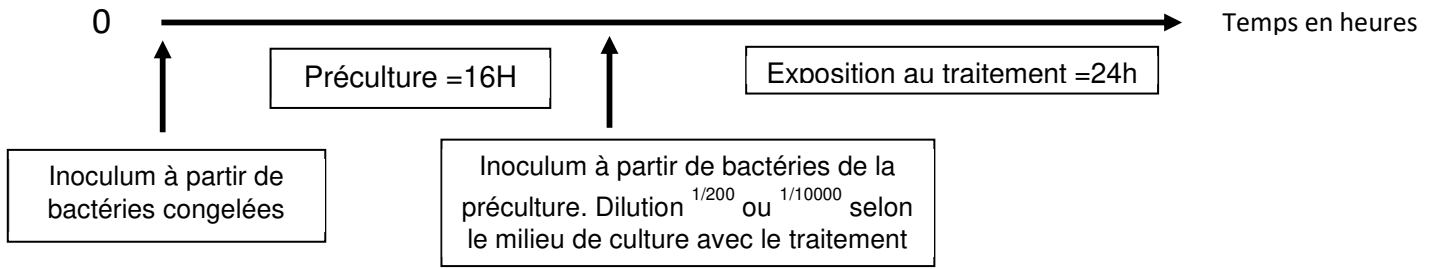


Figure 13. Durée de la culture bactérienne avant et après la mise en contact avec les vasopresseurs.

### 2.1.5 Analyses des courbes de croissance

La croissance bactérienne peut généralement se diviser en 4 étapes : 1/ une phase de latence, 2/ une phase exponentielle, 3-4/ une phase stationnaire et 4 / une phase de décroissance (figure 13).

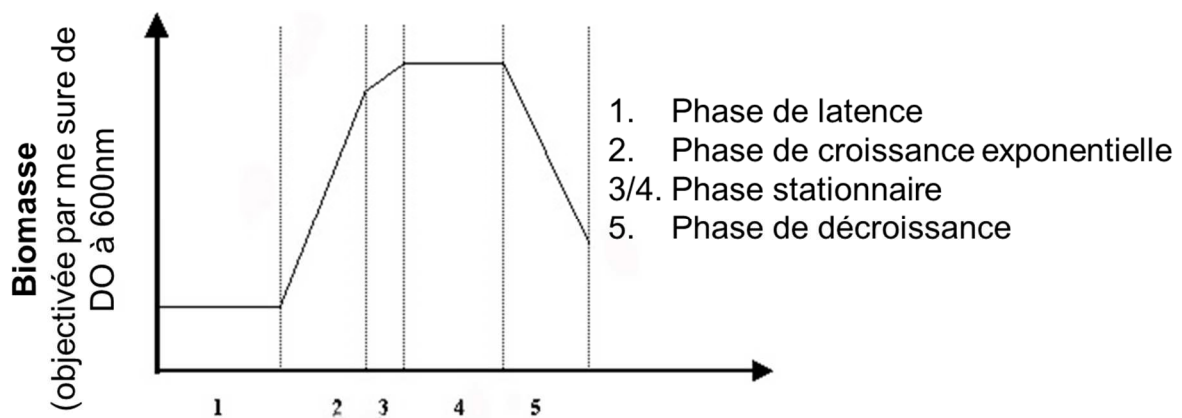


Figure 14. Etape de la croissance bactérienne

La valeur sélective, est la capacité d'un organisme à survivre et à se reproduire dans un environnement donné (316). Cette notion de fitness est particulièrement intéressante dans le domaine de la génétique des populations pour comprendre le succès évolutif d'un individu ou d'un groupe d'individus. Ainsi, la valeur sélective d'un organisme peut être déterminée par l'analyse de sa fréquence relative dans le temps (317). La détermination de la fitness d'un organisme est donc sous-tendue par la capacité de croissance de cet organisme par rapport aux autres organismes en compétition. Ce genre d'approche est particulièrement fastidieuse,

et de nombreuses études (318,319) utilisent le taux de croissance maximal ou maximal growth rate (MGR) comme paramètre permettant d'évaluer la valeur sélective. En effet, si le taux maximal de croissance d'un organisme « A » pris isolément est plus important que celui d'un organisme « B » pris isolément, on supputera que le succès évolutif est de l'organisme « A » est plus important que celui de l'organisme « B » s'ils sont placés en compétition.

Dans notre étude, nous avons donc réalisé des courbes de croissance bactérienne pour déterminer le taux de croissance maximal ou maximal growth rate (MGR) comme paramètre permettant d'évaluer la valeur sélective. Pour ce faire, les courbes de croissance ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe précédent, et la détermination du MGR a été réalisée en utilisant le script « tecantools » développé au laboratoire (318). Les différentes étapes du calcul sont schématisées dans la figure 15. Brièvement, la mesure de la Densité Optique à 600 nm reflétant la turbidité du milieu, donc la croissance bactérienne, a été mesurée en fonction du temps ( $DO = f(t)$ , en bleu sur la figure 15)). Dans un second temps, le  $\log(DO)$  est calculé afin de mieux visualiser les différences de croissance (en vert dans la figure 15). Enfin, le taux de croissance maximal correspond au maximum de la dérivée du logarithme de la courbe de croissance ( $MGR = \text{Max}(d\log(DO)/dt)$ , en noir dans la figure 15, le MGR étant indiqué par un cercle rouge).

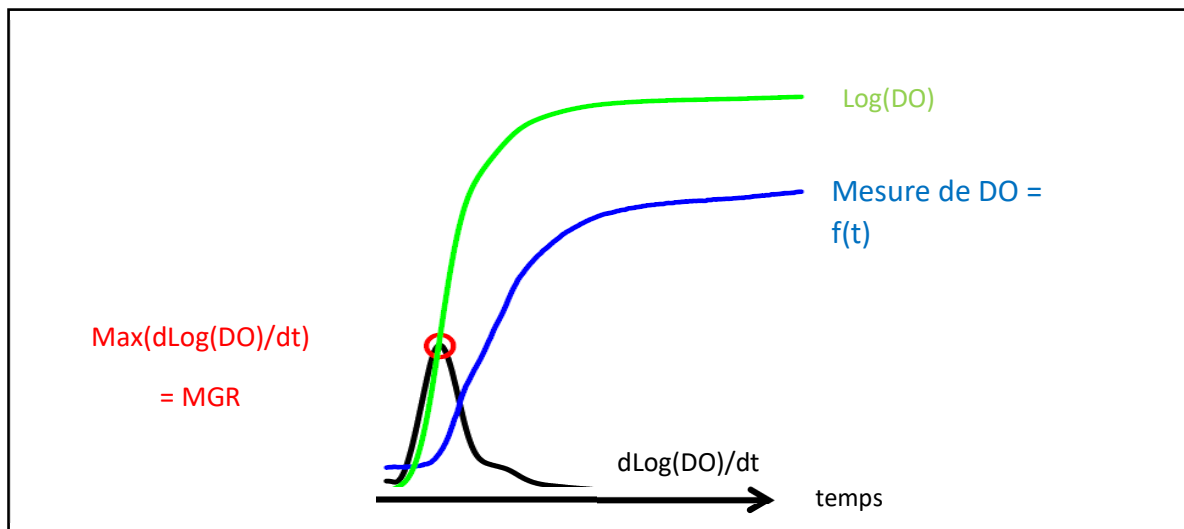


Figure 15. Calcul du taux de croissance maximal(320)

### 2.1.6 Western blot

#### Investigation d'un analogue de DPP3 chez *E. coli*

Après avoir réalisé une culture « nuit » (environ 16h sur un volume de 5mL) en présence de noradrénaline, angiotensine II, vasopressine en utilisant la souche 536, la souche de rat et le panel de souches testé. Cette culture a été utilisée pour préparer les protéines bactériennes destinées aux western-blots (WB) afin d'évaluer l'expression protéique du DPP3 bactérien.

La culture de nuit était ensuite centrifugée à 7000 tr/min pendant 5 minutes à 4°C. Puis le surnageant et le culot bactérien étaient congelés séparément (-80°C). Chaque culot était repris dans 1 ml de tampon de lyse RIPA (Tris HCl (2-amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol ; chlorhydrate) 20mM, KCl (chlorure de potassium) 100mM, EDTA (acide éthylène diaminetétraacétique) 1mM, EGTA(acide egtazique) 1mM, SodiumVanadate 0,2mM, glycerophosphate 20M, PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) 1mM, NaF (fluorure de sodium) 1mM, Antiproteases, DTT (dichlorodiphényltrichloroéthane) 1M, eau milliQ) et transféré dans un eppendorf de 2 mL. Chaque culot dans son tampon subissait une sonication

de 2 minutes puis était de nouveau centrifugé pendant 20 minutes à 13400 rpm (à 4°C). Les nouveaux surnageants et culots étaient de nouveaux séparés et conservés à -80°C.

Le dosage des protéines du surnageant est réalisé par la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay 23235 Thermoscientific®) c'est un dosage colorimétrique des protéines. Les échantillons sont dénaturés par incubation pendant 10min à 95°C dans un bloc chauffant après mélange avec le tampon de charge supplémenté en  $\beta$ -mercaptoéthanol (Laemmli 4X Biorad® 1610747). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel précoulé (Biorad® 4561095 ; -H<sub>2</sub>O, Acrylamide, Tris PH 8.8 à 1,5M, SDS 10%, APS (ammonium persulfate), Temed).

La phase de migration se faisait dans un tampon composé de 900mL d'eau MilliQ et 100mL de tampon Tris/Glycine/SDS (1610772 Biorad®). Puis la phase de transfert avait lieu dans un tampon composé de 200mL de tampon Tris/Glycine/SDS (1704270 Biorad®), 600mL d'eau MilliQ, 200mL d'éthanol absolu en utilisant le Trans-blot® turbo™. Après marquage des membranes au rouge ponceau, la phase de saturation était faite dans un tampon TBST-lait 5%. Les membranes sont plongées dans 5mL de tampon de saturation et 5 $\mu$ L d'anticorps primaire (Procizumab (PCZ) anticorps monoclonal Anti-DPP3 ; référence : # human ab 1967-4teen4 ; concentration initiale 3mg/mL avec dilution finale à 1/1000). Puis les membranes sont lavées dans un bain de TBST et de nouveau incubées dans 5mL de tampon de saturation et 0,5 $\mu$ L d'anticorps secondaire (Anti-human IgG Peroxidase produce in rabbit, SIGMA : A8792-2ml ; concentration initiale 10.0 - 20.0 mg/ml avec dilution finale à 1/10000).

Aucun gène de ménage ne peut être utilisé chez les bactéries. Les résultats seront interprétés qualitativement et non quantitativement.

## 2.2 Exploration *in vivo* de l'influence de la noradrénaline sur la croissance bactérienne

### 2.2.1 Protocole expérimental

Les modalités du modèle d'induction du sepsis et de monitoring échographique étaient les mêmes que le travail précédent.

L'évaluation de la charge bactérienne était faite en fonction de la perfusion de vasopresseur versus solution saline à une vitesse de 1ml/h (Figure 16).

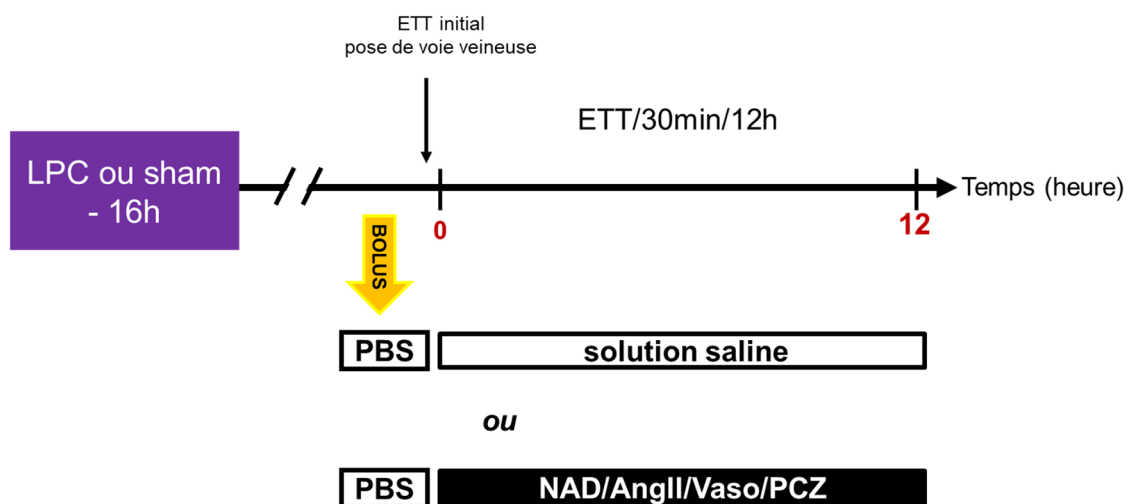


Figure 16. Protocole expérimental évaluant les effets de la noradrénaline, de l'angiotensine II, de la vasopressine et du PCZ sur la croissance bactérienne *in vivo*

(LPC, ligature ponction caecale ; ETT : échographie transthoracique ; PBS : Phosphate Buffered Saline ; NAD : noradrénaline ; Ang II :angiotensine II ; VASO : vasopressine ; PCZ : Procizumab® )

La LPC était effectuée la veille après échocardiographie initiale. A J0 (H16), après échocardiographie, si la fraction de raccourcissement (FR) était <45% les animaux étaient



inclus. Pour éviter des gestes invasifs et délétères, la mesure de la pression artérielle par cathéter artérielle n'était pas réalisée. Un prélèvement rétro-orbitaire (300µL de sang) était effectué avant la mise en place de la perfusion continue de vasopresseurs. Un volume de 100µL était étaler immédiatement sur gélose LB et incubé 37°C. Après 16 heures d'incubation, le décompte bactérien d'unités formant colonie (UFC) était réalisé. Le reste du prélèvement était utilisé pour le dosage des cytokines et marqueurs inflammatoires initiaux (chaque animal était son propre contrôle 200µL congelés à -80°C). Une fois le cathéter posé sur la veine caudale de la queue du rat, une compensation volémique des 300µL de sang par du NaCl était effectuée, puis une perfusion continue de vasopresseurs (dose cf. tableau 9) était débutée. Un monitoring par échographie cardiaque était réalisé initialement, puis toutes les 30min pour mesure de la FR. En cas de valeur de FR <45%, la mesure était de nouveau effectuée 15 min plus tard et en case de persistance de la FR <45%, la dose de vasopresseurs était majorée. Une surveillance de la température était réalisée par sonde rectale. A la fin de la procédure, les animaux étaient sacrifiés et les prélèvements de sang (EDTA + hépariné), urine, ascite, organes (cœur, poumon, rate, rein, foie) étaient réalisés. Un étalement de 4 dilutions par liquide biologique et d'organe (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>), soit 16 boites de pétri au total, était réalisé pour le comptage d'UFC. Les échantillons d'organes, une fois pesés, étaient préalablement homogénéisés dans 1 mL de sérum physiologique grâce à un Broyeur à billes (TissueLyser II™ QIAGEN®) avant la mise en culture de 100µL de broyat par gélose.

Pour finir des dosages des cytokines pro et anti-inflammatoires (IL-10, TNF α) des prélèvements de sang était effectués avant et après perfusion de vasopresseur à l'aide de kit ELISA spécifique du rat (TNF-alpha SIGMA RAB0479 ; IL10 SIGMA RAB0246).

### 2.2.2 Ethique

Toutes les expériences utilisant des animaux de laboratoire ont été menées dans notre laboratoire, conformément aux directives des Instituts nationaux et européens de la santé et ont été approuvées par le comité local d'éthique de la recherche animale (Lariboisière-Villemin, Paris, France) (APAFIS#9385-2016113016181432 v4).

## 2.3 Analyse Statistique

La normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro Wilk. Les moyennes des taux de croissance maximale ont été comparées à l'aide du t-test ou du test Mann-Whitney bilatéral. Pour le calcul d'une différence globale inter-groupe un test de Kruskal Wallis a été utilisé et afin d'ajuster la *P*-value pour cette comparaison multiple avec une correction de Bonferroni

Les UFC étaient exprimés en moyenne avec leur écart-types.

Seules les valeurs de *p* inférieures à 0.05 étaient considérées significatives.

## 3 Résultats

### 3.1 Evaluation des effets des thérapies vasopressives du sepsis sur la croissance microbienne *in vitro*

#### 3.1.1 Noradrénaline

##### 3.1.1.1 En milieu LB : évaluation de l'effet-dose de la noradrénaline sur le MGR de *E. coli* 536

A partir de la dose utilisée dans le travail de Lyte et al.(111), soit  $5 \times 10^{-4}$  M de Noradrénaline, nous avons dilué la noradrénaline d'un facteur 10 en cascade 10 fois de suite. Le box plot de gauche représente la souche *E. coli* 536 en l'absence de traitement, les 10 suivants représentent 536 avec des doses décroissantes de NAD de  $10^{-3}$  à  $10^{-12}$  M. Une comparaison intergroupe réalisée, retrouvait un taux de croissance maximal (MGR) d'*E. coli* 536 est très

abaissé ( $P = 2.5 \times 10^{-10}$ ). Par ailleurs le MGR est abaissé dans un milieu riche jusqu'à des doses physiologiques de NAD à  $10^{-9}$  M ( $P < 0.05$ ) (figure 17).

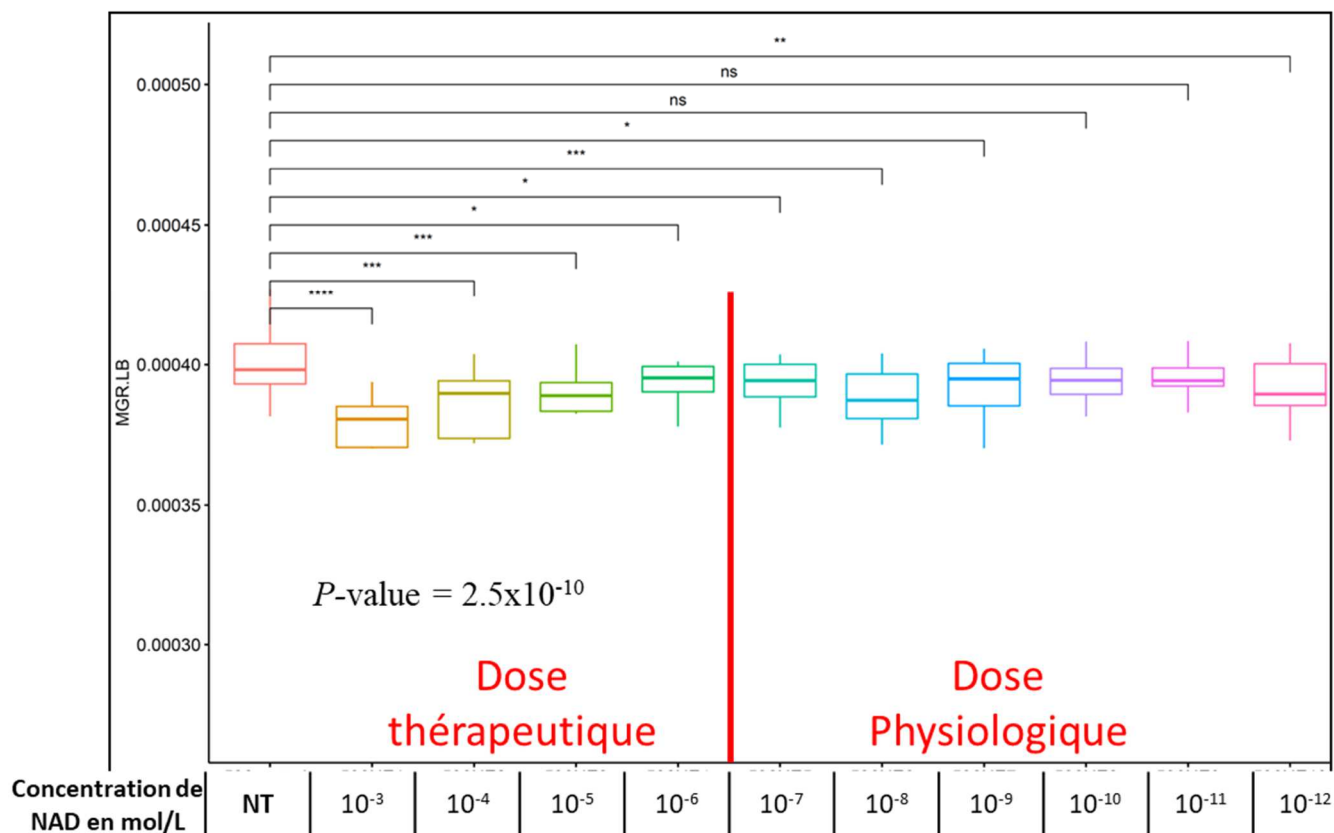


Figure 17. Effet dose de la noradrénaline sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu riche

(\* $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  ; le box plot de gauche représente le référence du MGR en absence de NAD, N=9 ; NT : non traitée)

### 3.1.1.2 En milieu LB : évaluations de l'effet de la noradrénaline sur le MGR du panel de souches testé

En présence de NAD (box plot gris), la majorité des souches ont une fitness réduite ( $P < 0,05$ ) en milieu riche. Les souches NILS 1, 2, 18, 57, 59 ne semblent pas sensibles à l'effet de NAD et elles n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (B1, B2, D1) (Figure 18).

En moyenne la réduction du MGR sur l'ensemble du panel était de 4,3% [IC 95% (-8,9 ; 0,6)].

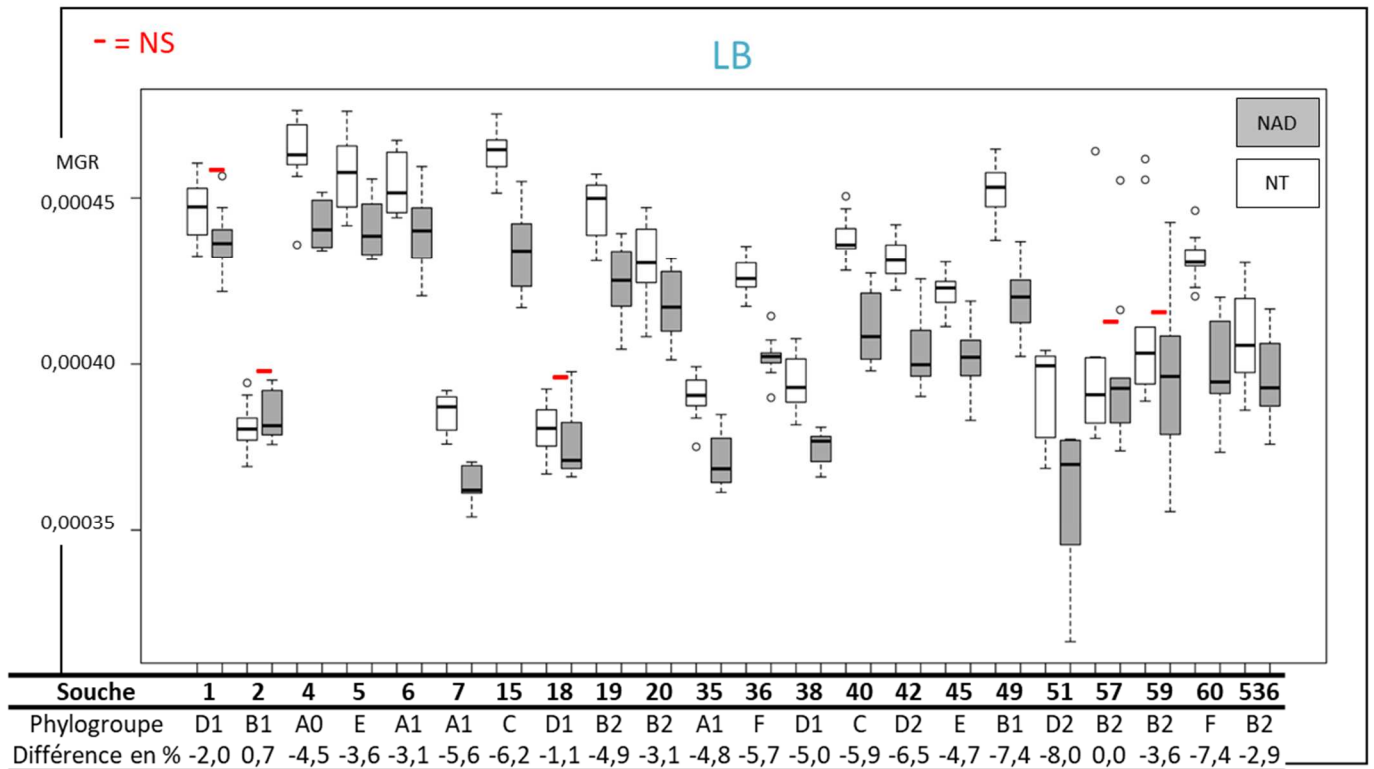


Figure 18. Effet de de la Noradrénaline sur la fitness du panel de souches testé en milieu riche

(Gris les souches traitées avec la NAD en blanc souches non traitées, N=9 ; NAD : Noradrénaline, NT : non-traité ; NS non significatif, Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.1.3 En milieu sérum-SAPI : évaluation de l'effet dose de la noradrénaline sur le MGR de *E. coli* 536

A partir de la dose utilisée dans le travail de Lyte et al.(111) soit  $5 \times 10^{-4}$  M de noradrénaline, nous avons diluée la noradrénaline d'un facteur 10 en cascade 10 fois de suite (Figure 20). Le box plot de gauche représente la souche *E. coli* 536 en l'absence de traitement, les 10 suivants représentent 536 avec des doses décroissantes de  $10^{-3}$  à  $10^{-12}$  M. Lorsque l'on effectuait une comparaison intergroupe, le taux de croissance maximal (MGR) d'*E. coli* 536 est augmenté ( $P=2 \times 10^{-7}$ ). Par ailleurs, le MGR est augmenté dans un milieu stressant jusqu'à des doses thérapeutiques de  $10^{-6}$  M ( $P < 0.05$ ).

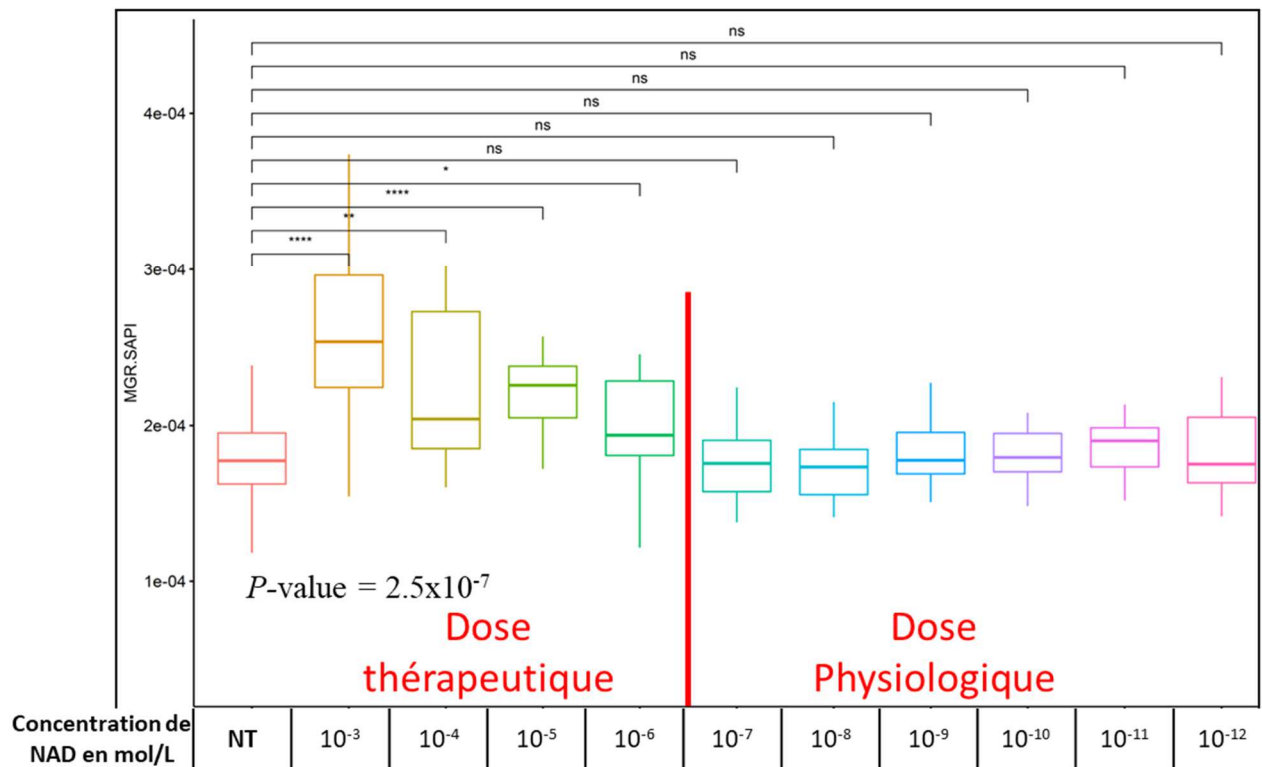


Figure 19. Effet dose de la noradrénaline sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu stressant

(\* $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  ; le box plot de gauche représente le référence du MGR en absence de NAD ; N=9 ; NT :non traitées)

#### 3.1.1.4 En sérum-SAPI : évaluations de l'effet de la noradrénaline sur le MGR du panel de souches testé

En présence de NAD (box plot gris), la totalité des souches ont un MGR augmenté ( $P < 0.0001$ ) en milieu stressant (figure 20).

En moyenne, l'augmentation du MGR sur l'ensemble du panel est de 54,3% [IC 95% (27,3 ; 81,3)]

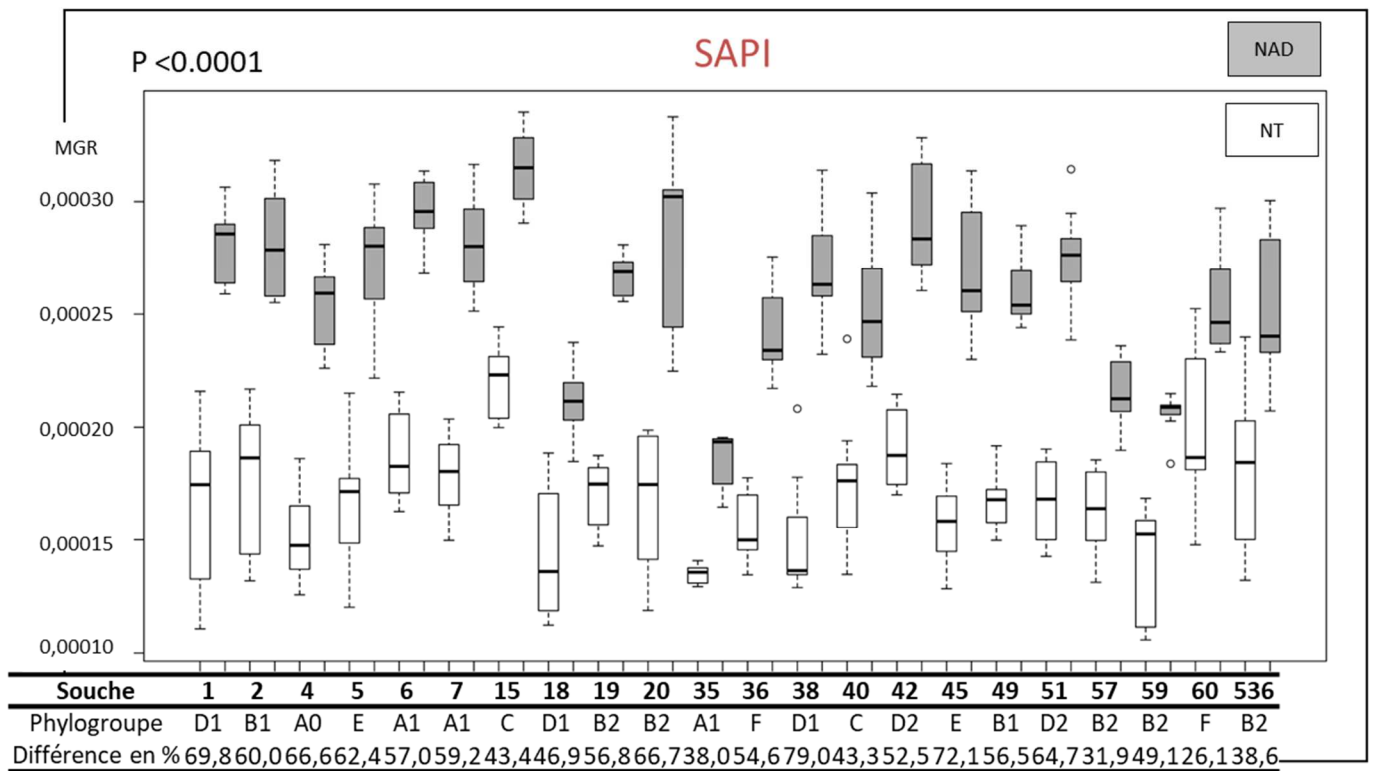


Figure 20. Effet de de la Noradrénaline sur la fitness du panel de souches testé en milieu stressant

(Gris les souches traitées par NAD en blanc souche non traitées, N=9 ; NAD : Noradrénaline, NT : non-traité, Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.1.5 En milieu urine : évaluations de l'effet de la noradrénaline sur le MGR du panel de souches testé

En présence de NAD (box plot gris), la majorité des souches ont un fitness significativement augmenté ( $P < 0.05$ ) en milieu urine. Les souches NILS 1, 5, 20, 36, 38, pour lesquelles la différence n'est pas significative, n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (B2, D1, E, F) (figure 21).

En moyenne l'augmentation du MGR sur l'ensemble du panel est de 177,3% [IC 95% (-121,9 ; 476,4)].

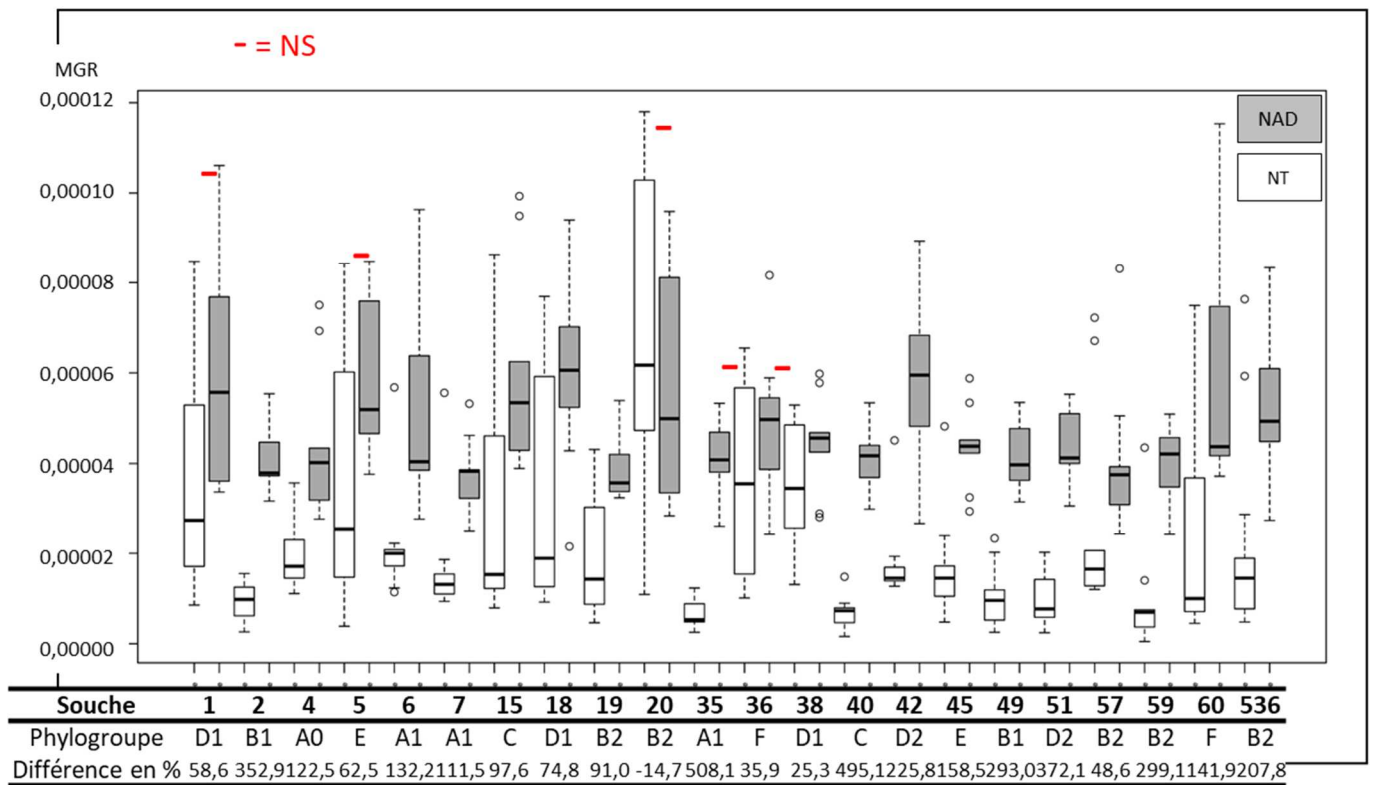


Figure 21. Effet de la Noradrénaline sur la fitness du panel de souches testé en milieu urine

(Gris les souches traitées par NAD en blanc souche non traitées, N=9 ; NAD : Noradrénaline, NT : non-traité ; NS non significatif ; Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.1.6 Synthèse des observations pour la noradrénaline

Pour la noradrénaline, nous avons observé une réduction du MGR en milieu riche (LB) jusqu'à des doses physiologiques et une augmentation en sérum SAPI jusqu'à des doses thérapeutiques. Par ailleurs, une augmentation du MGR a été observée en milieu urine.

Les modifications de MGR concernent l'ensemble des souches de *E. coli* testées, malgré leur grande hétérogénéité génétique. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'espèce *E. coli* présente une grande diversité génétique, et le panel de souches testées appartient à des fonds

génétiques différents, objectivé par une diversité de groupes phylogénétiques, de virulence, ou de site d'isolement (tableau 8).

Ainsi, les effets observés semblent communs à toute l'espèce *E. coli*, et sont donc la dépendance de gènes communs à l'ensemble de l'espèce, appartenant au « core génome » de l'espèce.

### 3.1.2 Angiotensine II

#### 3.1.2.1 En milieu LB : évaluation de l'effet dose de l'angiotensine II sur le MGR de *E. coli* 536

En plus de la dose thérapeutique de l'angiotensine II ( $X = 10^{-7}$  mol/L), les effets d'une concentration 10 fois plus (10X) et 10 fois moindres (0,1X) élevée ont été testées sur *E. coli* 536. Il n'y a pas de différence du MGR d'*E. coli* 536, en fonction de la concentration d'angiotensine II ( $P > 0.05$ ) (figure 22).



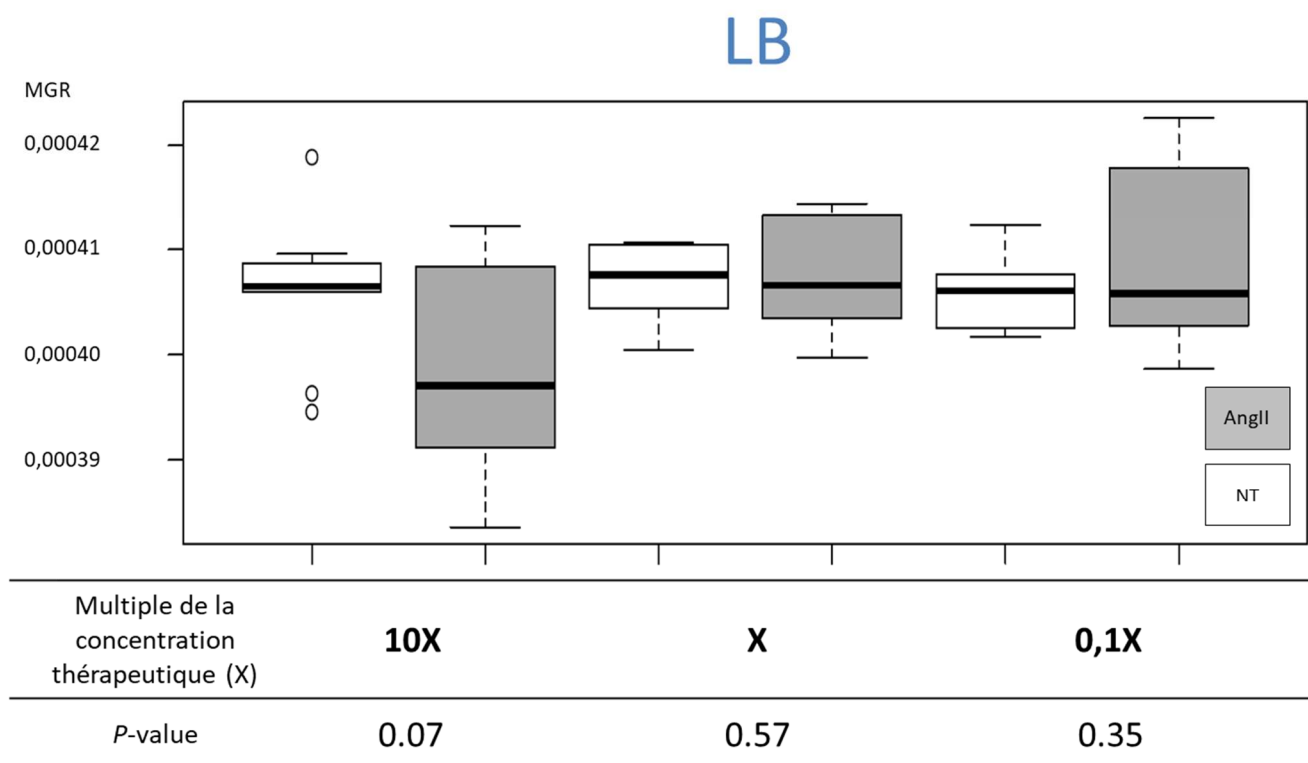


Figure 22. Effet dose de l'angiotensine II sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu riche

(Gris les souches traitées par Ang II en blanc souches non traitées. N=9, Ang II : Angiotensine II, NT : non-traité)

### 3.1.2.2 En milieu LB : évaluations de l'effet de l'angiotensine II sur le MGR de la du panel de souches testé

En présence d'Ang II (box plot gris), aucun effet n'a été observé sur le MGR de la majorité du panel de souches testé en milieu riche ( $P > 0.05$ ). Les souches NILS 5, 40, pour lesquelles la différence n'est pas significative, n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (C, E). Le MGR d'*E. coli* 536 a été mesuré en présence de sérum physiologique seul, et ce solvant n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne distincte de l'angiotensine II (figure 23).

En moyenne l'augmentation du MGR sur l'ensemble du panel est de 2,2% [IC 95% (-1,6 ; 1,6)].

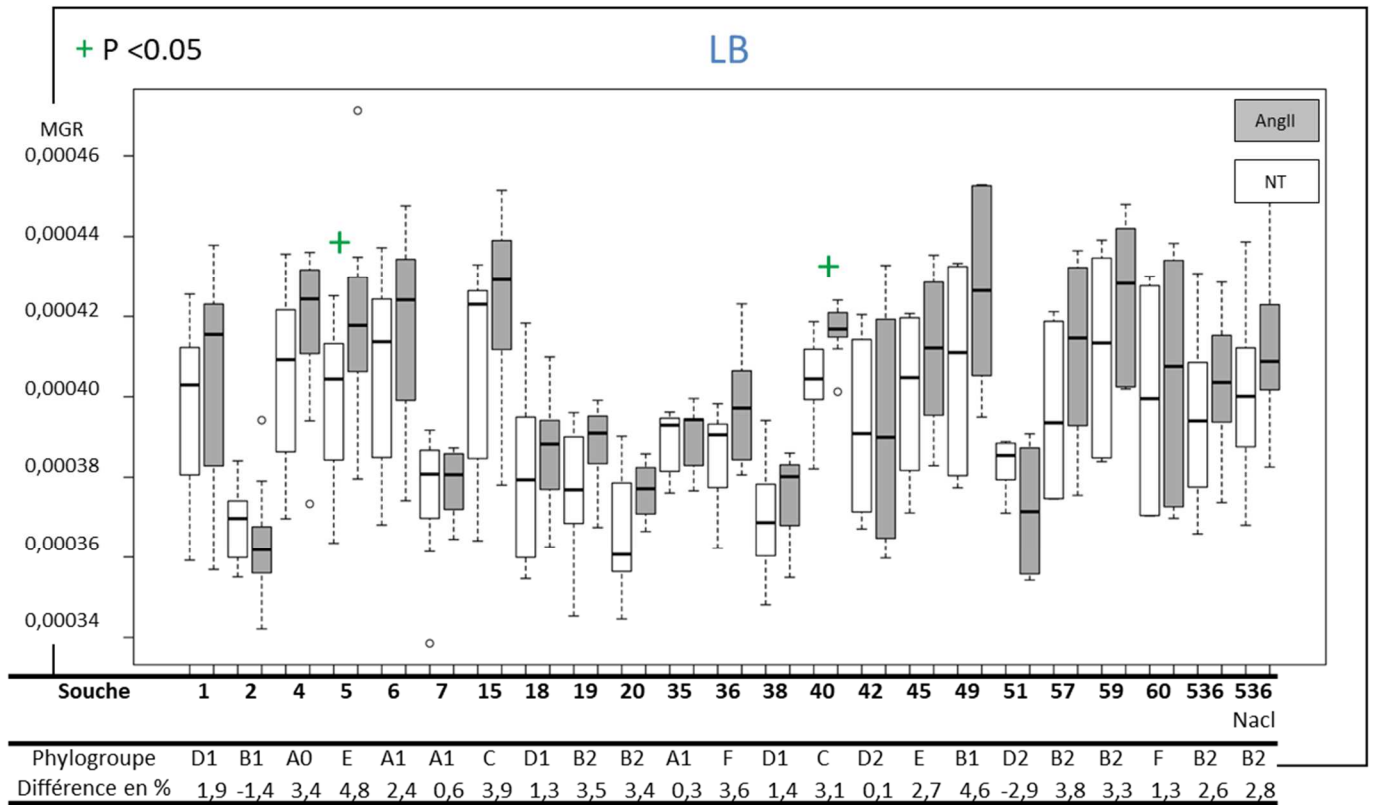


Figure 23. Effet de l'angiotensine II sur la fitness du panel de souches testé en milieu LB

(Gris les souches traitées par Ang II, en blanc souches non traitées. N=9, Ang II : Angiotensine II, NT : non-traité, Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.2.3 En milieu sérum-SAPI : évaluation de l'effet dose de l'angiotensine II sur le MGR d'*E. coli* 536

En plus de la dose thérapeutique de l'angiotensine II ( $X=10^{-7}M$ ), les effets d'une concentration 10 fois plus (10X) et 10 fois moins (0,1X) élevée ont été testées sur *E. coli* 536. Il n'y a pas de différence significative du MGR d'*E. coli* 536 en fonction de la concentration ( $P>0.05$ ), hormis pour la concentration thérapeutique où le MGR est réduit ( $P<0.05$ ) (figure 24).

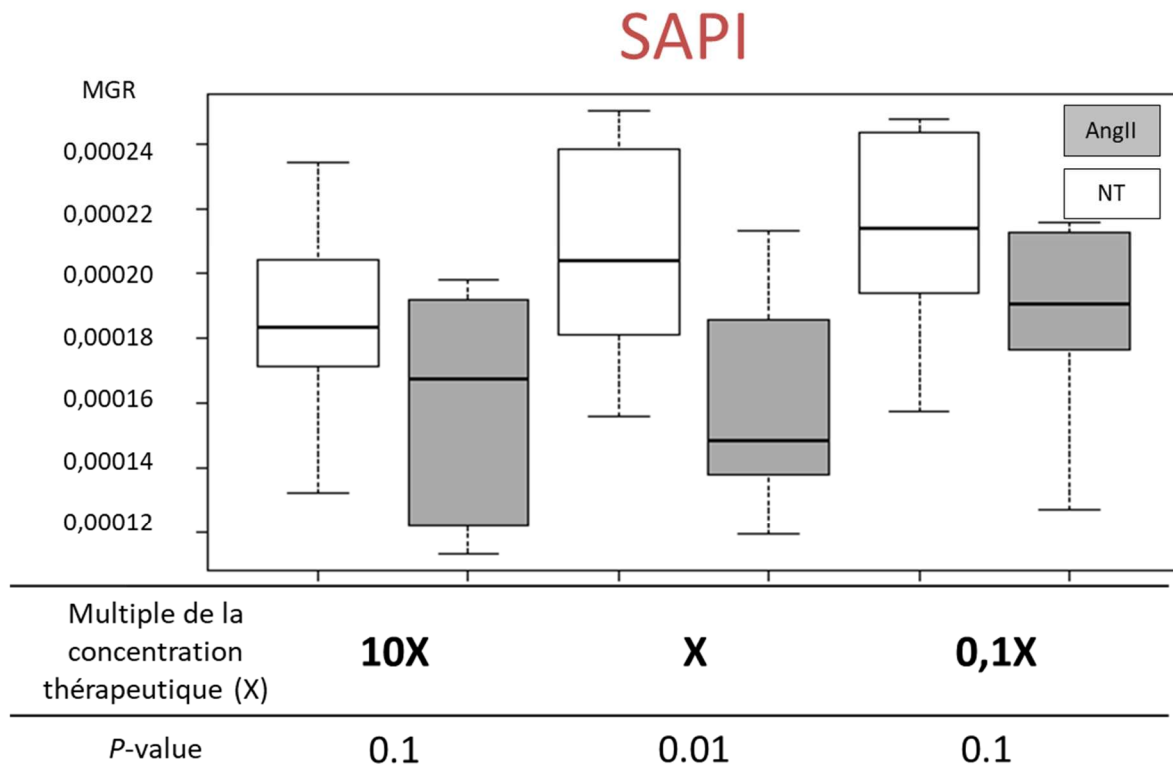


Figure 24. Effet dose de l'angiotensine II sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu stressant

(Gris les souches traitées par Ang II et en blanc souches non traitées. N=9, Ang II : Angiotensine II, NT : non-traité)

#### 3.1.2.4 En milieu sérum-SAPI : évaluations de l'effet de l'angiotensine II sur le MGR du panel de souches testé

En présence d'Ang II (box plot gris), aucun effet n'a été observé sur le MGR pour l'ensemble du panel testé en milieu sérum-SAPI ( $P$ -value :  $>0.05$ ) Le MGR d'*E. coli* 536 a été déterminé en présence de sérum physiologique seul, et ce solvant n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne distinct de l'angiotensine II (figure 25).

En moyenne, la réduction du MGR sur l'ensemble du panel est de 1,8% [IC 95% (-9,9 ; 6,4)].

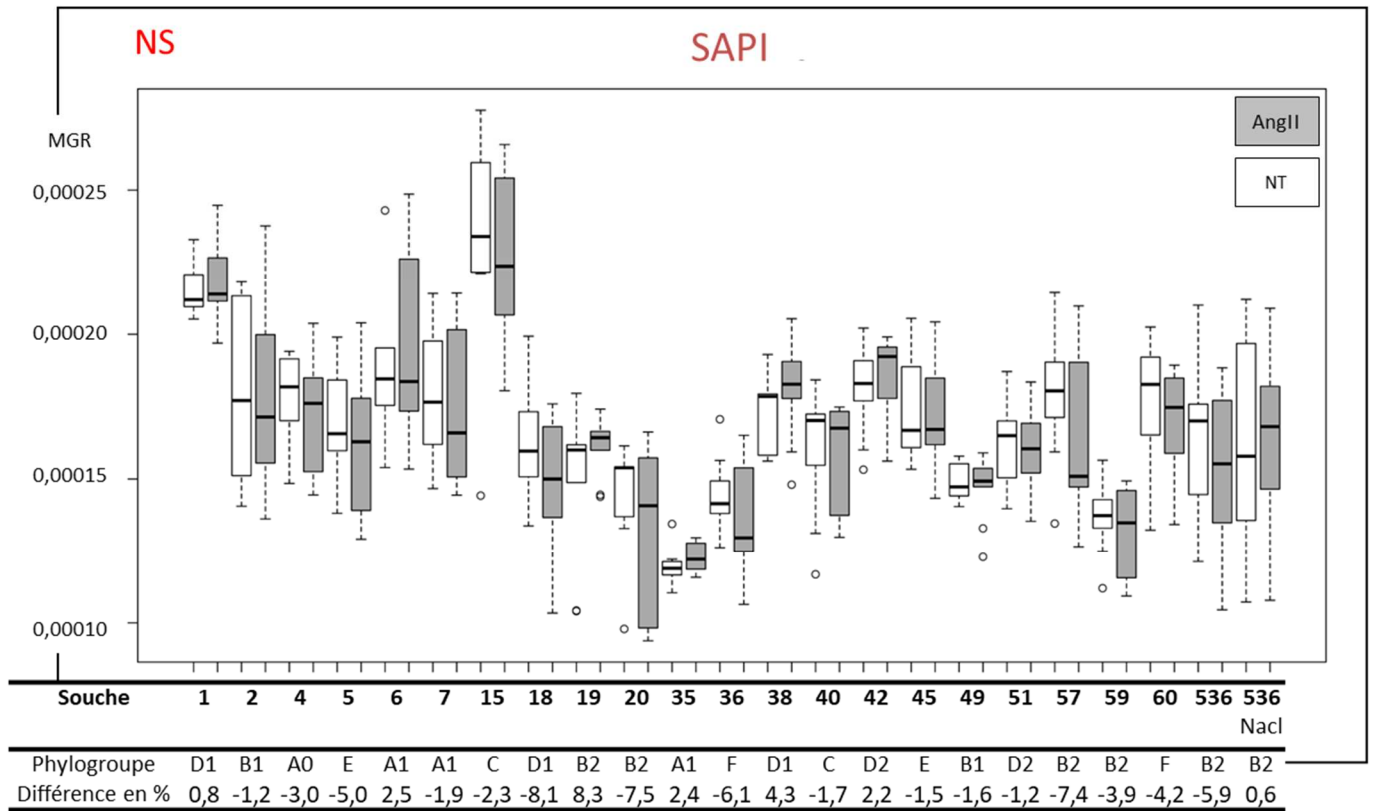


Figure 25. Effet de l'angiotensine II sur la fitness du panel de souches testé en milieu stressant

(Gris les souches traitées par Ang II en blanc souches non traitées. N=9 ; NS : non significatif ; Ang II : Angiotensine II, NT : non-traité ; Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.2.5 En milieu urine : évaluations de l'effet de l'angiotensine II sur le MGR du panel de souches testé:

La croissance en milieu urine étant très faible, le calcul du MGR n'a pas été possible. Comme illustré dans par la figure 26, les courbes de croissance extrêmement faibles ne sont pas exploitable pour la détermination du MGR.

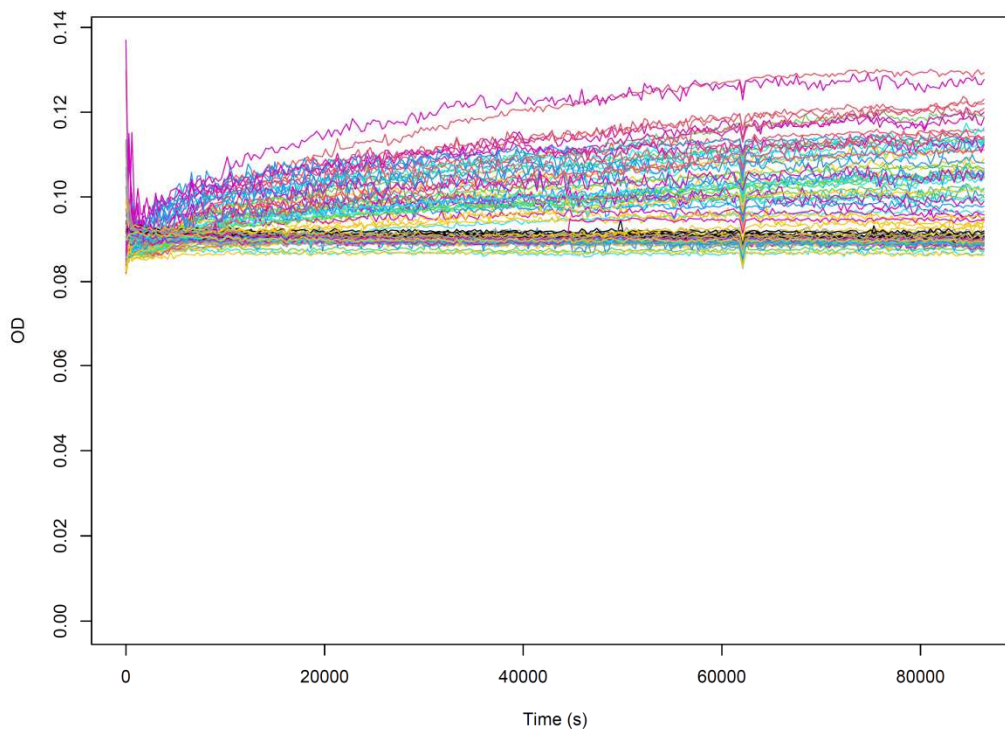


Figure 26. Courbe de croissance sur sur 24h du panel de souches testé en présence d'Ang II

### 3.1.2.6 Synthèse des observations pour l'Angiotensine II

L'effet de l'angiotensine II, que ce soit en LB ou sérum SAPI, n'a pas d'influence sur le MGR sans distinction du phylogroupe. Il n'y a pas d'effet-dose observé.

### 3.1.3 Vasopressine

#### 3.1.3.1 En milieu LB : évaluation de l'effet-dose de la vasopressine sur la fitness de *E. coli* 536

En plus de la dose thérapeutique de la vasopressine ( $X=10^{-9}$  mol/L), les effets d'une concentration 10 fois plus (10X) et 10 fois moins (0,1X) élevée ont été testées sur *E. coli* 536. Il n'y a pas de différence significative du MGR d'*E. coli* 536 en fonction de la concentration ( $P>0.05$ ) sauf pour 10X ou le MGR est réduit ( $P<0.05$ ) (figure 27).

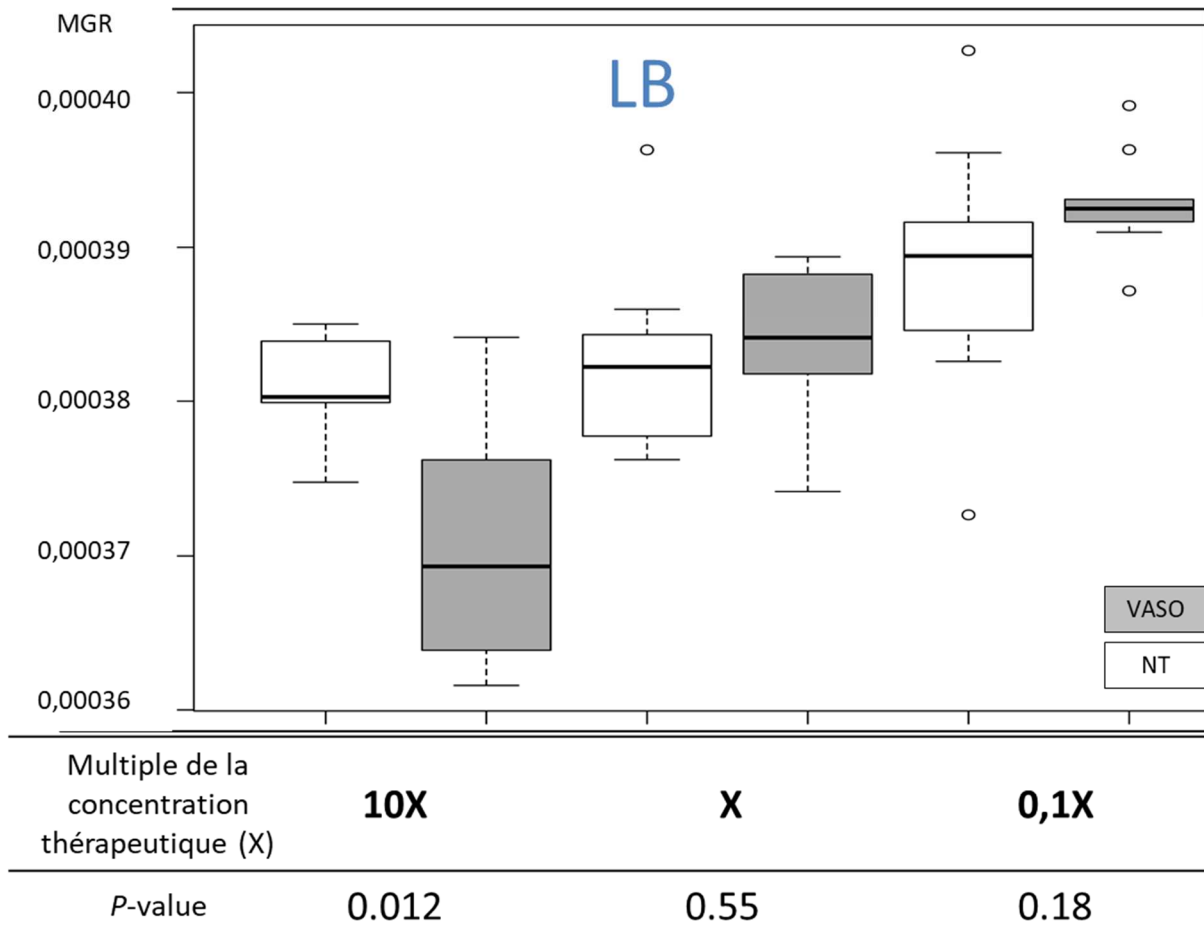


Figure 27. Effet dose de la vasopressine sur la fitness d'*E. coli* 536 en milieu LB

(Gris les souches traitées par VASO en blanc souches non traitées N=9, VASO: vasopressin, NT : non-traité)

### 3.1.3.2 En milieu LB : évaluations de l'effet de vasopressine sur le MGR du panel de souches testé

Aucun effet de la vasopressine (figure 28, box plot gris) n'a été observé sur le MGR de la majorité du panel de souches testé en milieu LB ( $P > 0.05$ ). Le MGR d'*E. coli* 536 a été mesuré en présence de sérum physiologique seul, et ce solvant n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne distincte de la vasopressine. En moyenne, l'augmentation du MGR sur l'ensemble du panel est de 0,1% [IC 95% (-2,6 ; 2,3)].

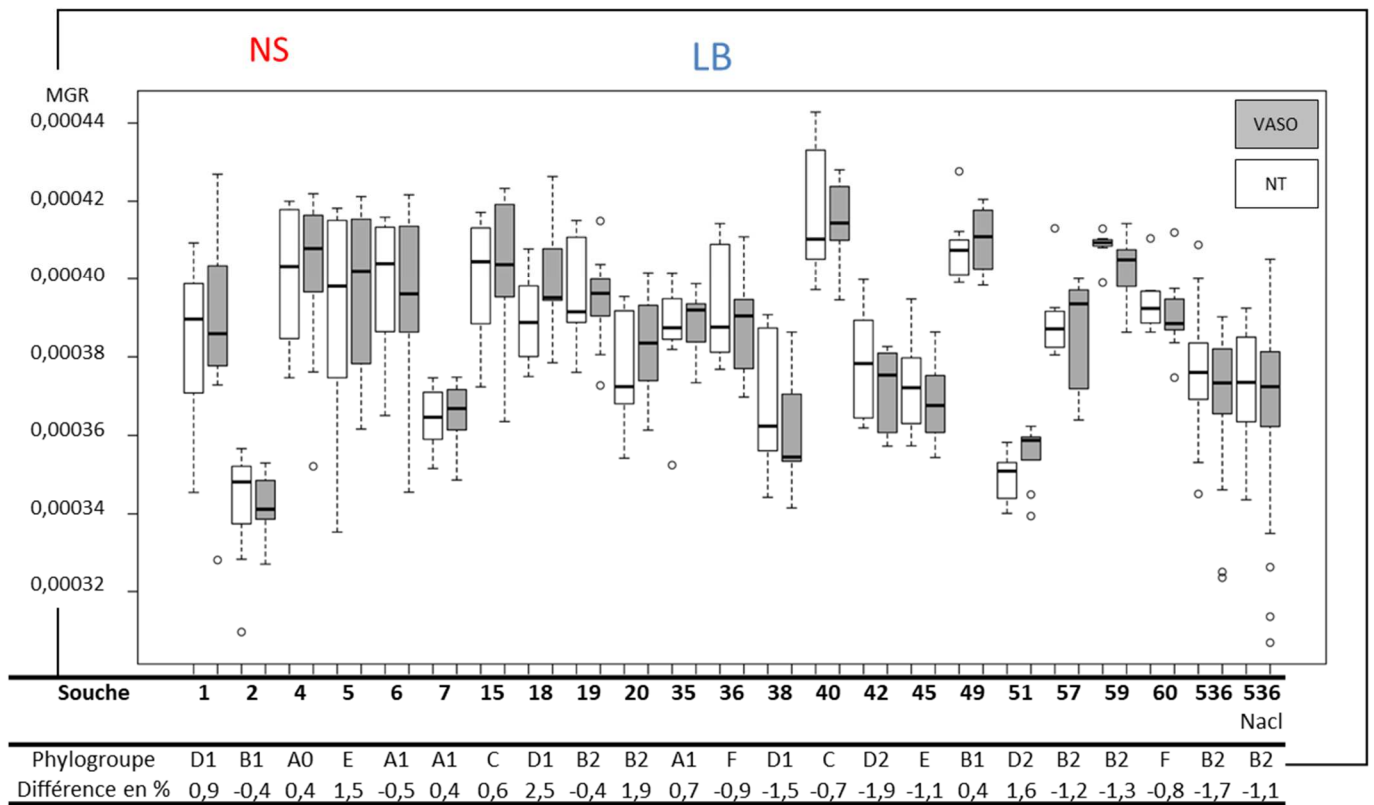


Figure 28. Effet de la Vasopressine sur la fitness du panel de souches testé en milieu riche

(Gris les souches traitées par VASO, en blanc souches non traitées. NS : non significatif ; N=9 ; VASO : Vasopressine ; NT : non-traité, Différence en % : différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.3.3 En milieu sérum-SAPI : évaluation de l'effet dose de la vasopressine sur le MGR de 536

En plus de la dose thérapeutique de la vasopressine ( $X=10^{-9}$  mol/L), les effets d'une concentration 10 fois plus (10X) et 10 fois moins (0,1X) élevée ont été testés sur *E. coli* 536. Il n'y a pas de différence significative du MGR de *E. coli* 536 en fonction de la concentration ( $P > 0.05$ ) sauf pour 10X ou le MGR est significativement augmenté ( $P < 0.05$ ) (figure 29).

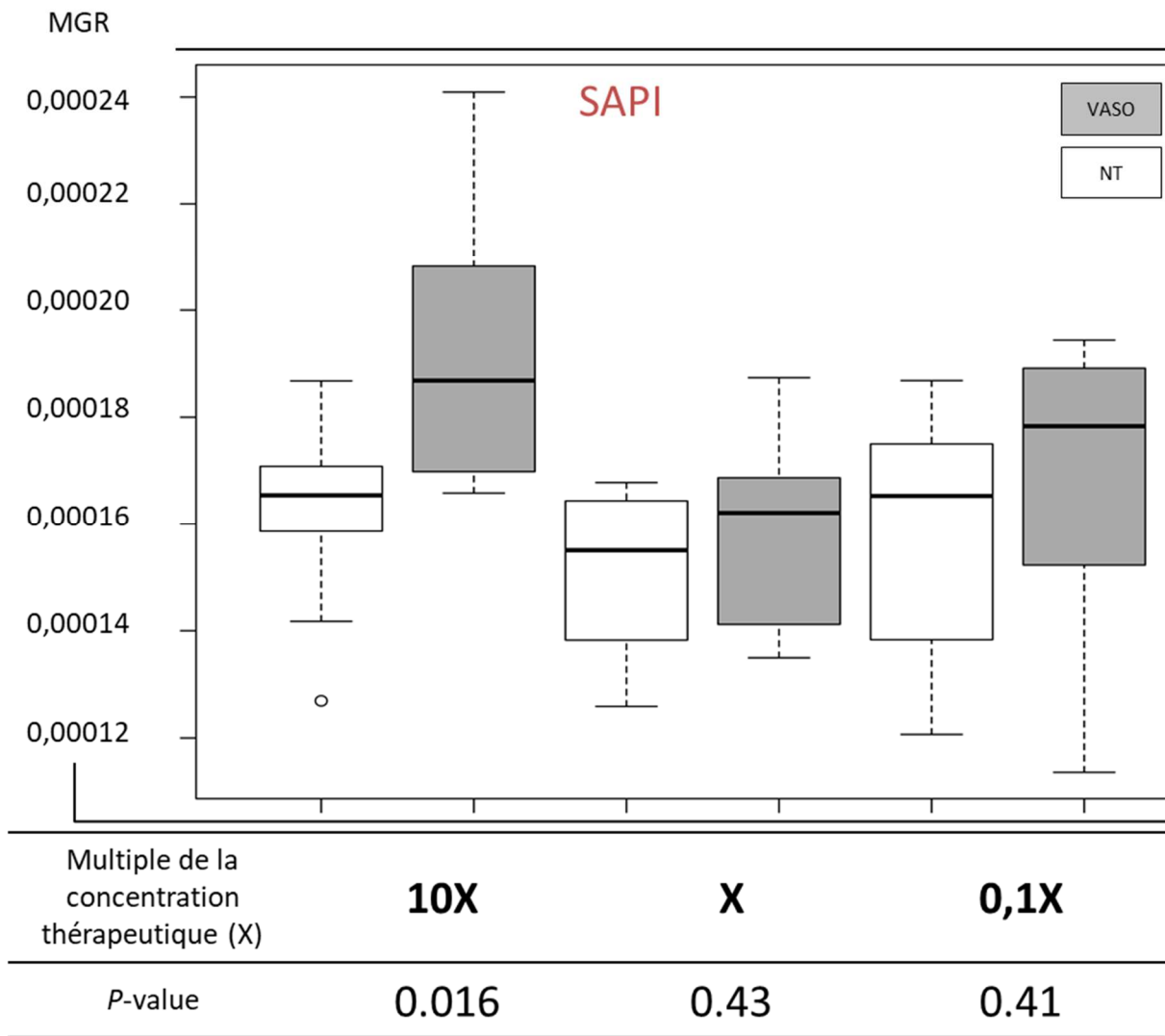


Figure 29. Effet dose de vasopressine sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu stressant

(Gris les souches traitées par VASO, en blanc souches non traitées. N=9, VASO : vasopressine, NT : non-traité)

#### 3.1.3.4 En milieu sérum-SAPI : évaluations de l'effet de la vasopressine sur le MGR du panel de souches testé

En présence de Vasopressine (figure 30, box plot gris), aucun effet n'a été observé sur le MGR de la majorité des souches du panel de souches testé en milieu LB ( $P > 0.05$ ). Les rares souches (36, 49, 57), pour lesquelles la différence est significative, n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (B1, B2, F). Le MGR d'*E. coli* 536 a été mesuré en présence de sérum



physiologique seul, et ce solvant n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne distincte de vasopressine.

En moyenne l'augmentation du MGR sur l'ensemble du panel est de 2,9% [IC 95% (-13,2 ; 18,9)].

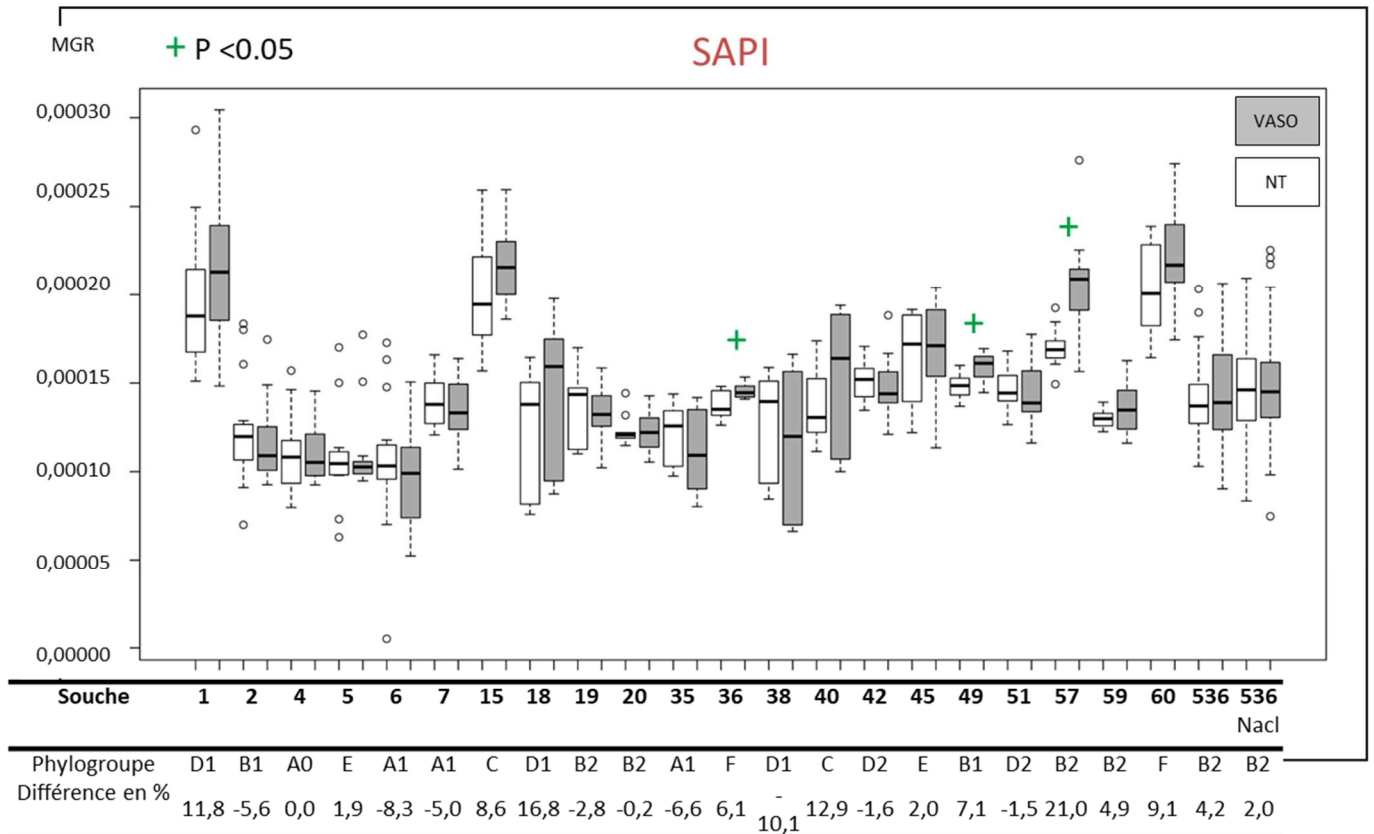


Figure 30. Effet de la Vasopressine sur la fitness du panel de souches testé en milieu stressant

(Gris les souches traitées par VASO, en blanc souches non traitées. N=9 VASO : Vasopressine ; NT : non-traité, différence en pourcentage du MGR moyen entre le 2 groupes)

### 3.1.3.5 En milieu urine : évaluations de l'effet de la vasopressine sur le MGR fitness du panel de souches testé

La croissance en milieu urine étant très faible, le calcul du taux de croissance n'a pas pu être déterminé (figure 31).

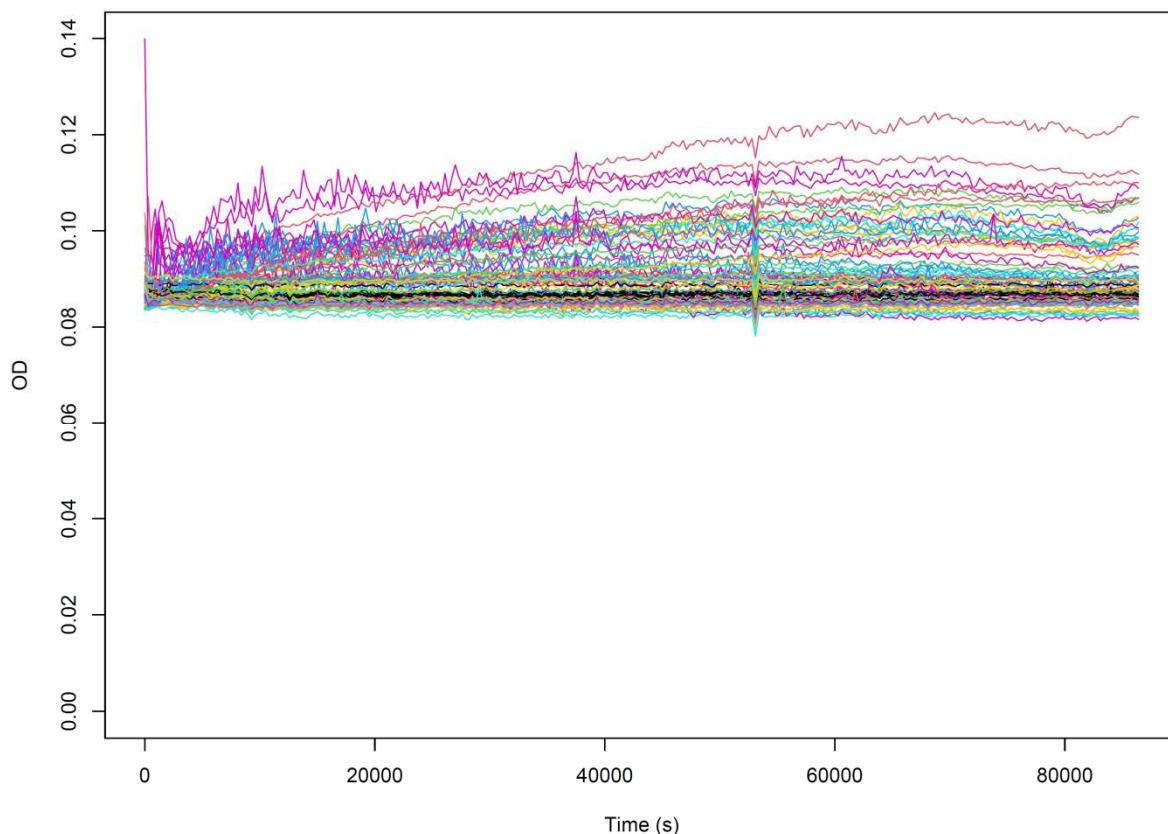


Figure 31. Courbe de croissance du panel de souches testé en présence de vasopressine sur 24h

### 3.1.3.6 Synthèse Vasopressine

La vasopressine n'a pas d'influence sur le MGR d'*E. coli* quel que soit le milieu utilisé, sans distinction de phylogroupe. Un effet-dose de la vasopressine est toutefois observé à 10X de la concentration thérapeutique, avec un MGR augmenté en milieu sérum-SAPI et diminué en milieu LB.

### 3.1.4 Effet du Procizumab sur la croissance bactérienne

#### 3.1.4.1 En milieu LB : évaluation de l'effet-dose de PCZ sur le MGR de *E. coli* 536

A partir de la dose de la solution mère de Procizumab<sup>®</sup> (10 mg/mL), nous avons dilué le PCZ d'un facteur 10 en cascade 10 fois de suite. Le milieu de dilution utilisé était le PBS, du fait

d'une mauvaise solubilité de cet anticorps en sérum physiologique. De ce fait, c'était le PBS qui était utilisé comme contrôle. Les box plot gris représentent la souche *E. coli* 536 en présence de PCZ, et le blanc en PBS. Le MGR est augmenté jusqu'à des concentration de  $10^{-7}$  mg/mL ( $P$ -value < 0.05) de PCZ en milieu riche (figure 32 et 33).

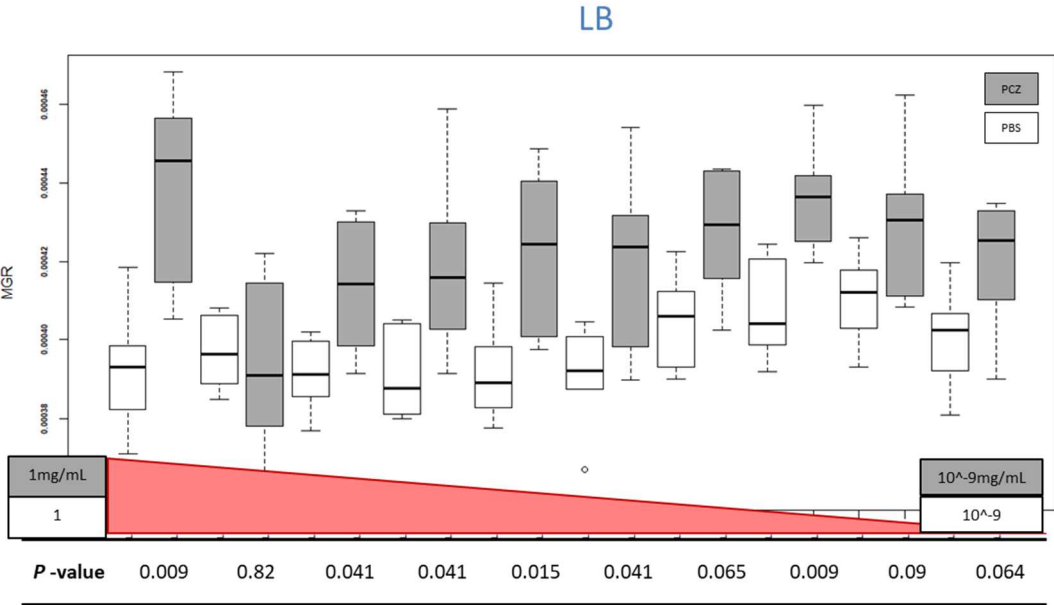


Figure 32. Effet dose du PCZ sur la fitness d'*E. coli* 536 en milieu riche

(Gris les souches traitées par PCZ, en blanc souche non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

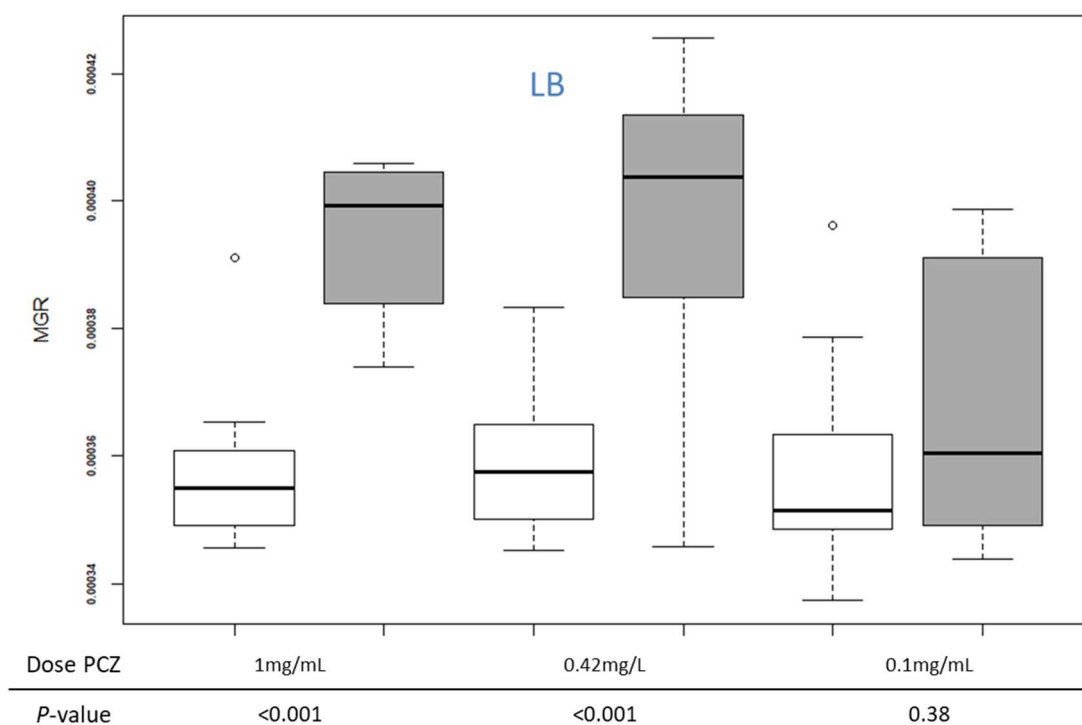


Figure 33. Effet dose du PCZ sur la fitness d'*E. coli* 536 en milieu riche dont l'effet à dose thérapeutique (0,42 mg/mL)

(Gris les souches traitées par PCZ, en blanc souche non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

#### 3.1.4.2 En milieu LB : évaluations de l'effet de PCZ sur le MGR du panel de souches testé

En présence de PCZ à concentration thérapeutique (figure 34, box plot gris), la majorité des souches ont un fitness significativement augmenté ( $P<0.05$ ) en milieu LB. Les souches pour lesquelles la différence n'est pas significative (2, 7, 35, 38, 45, 51) n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (A1, B1, D1, E).

En moyenne, la réduction du MGR sur l'ensemble du panel est de 7,5% [IC 95% (-2,5 ; 17,4)].

LB

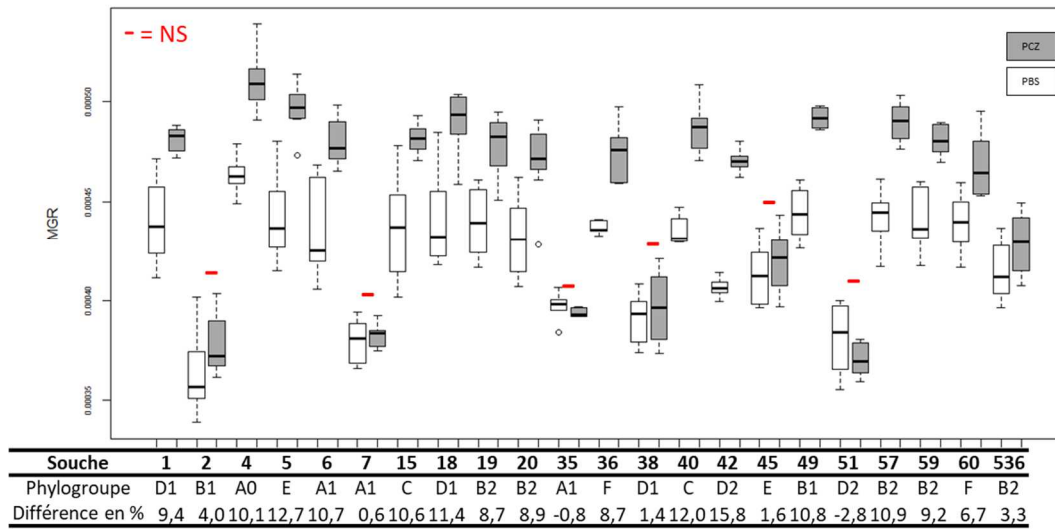


Figure 34. Effet du PCZ sur la fitness du panel de souches testé en milieu riche

(Gris les souches traitées par PCZ, en blanc souches non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

### 3.1.4.3 En milieu sérum-SAPI : évaluation de l'effet dose de la PCZ sur le MGR de *E. coli* 536

Comme précédemment, à partir des solutions mères de PCZ et PBS, l'effet dose du PCZ sur *E. coli* 536 a été évalué. Les box plot gris (figure 35 et 36) représentent la souche *E. coli* 536, avec traitement par PCZ, et le blanc avec PBS. En milieu stressant, le PCZ n'influe pas sur le MGR et sans distinction de la concentration de PCZ ( $P > 0.05$ ) de PCZ.

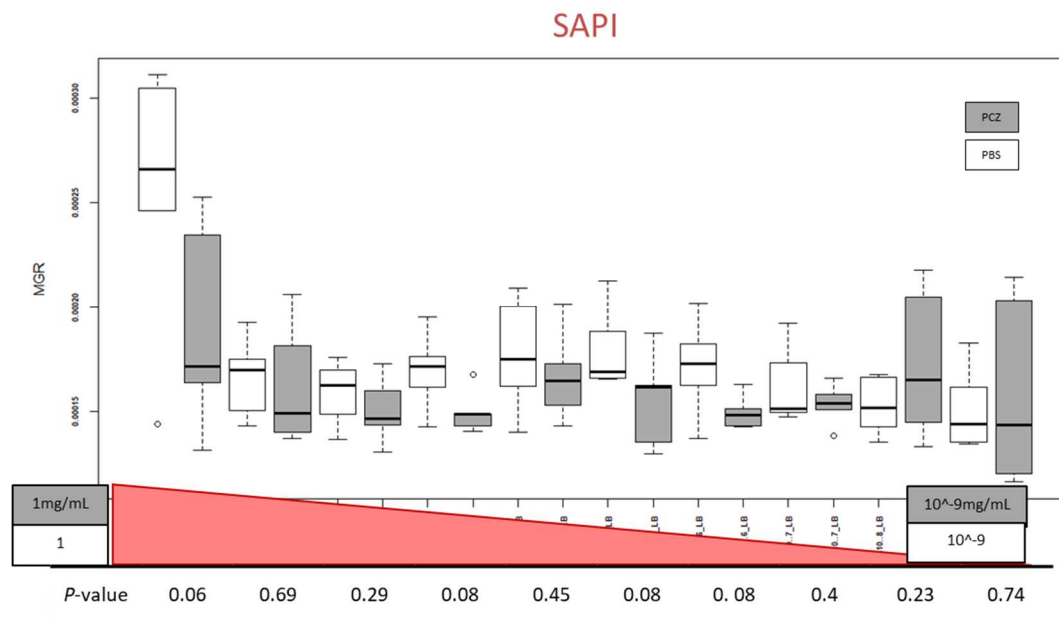


Figure 35. Effet dose du PCZ sur la fitness de *E. coli* 536 en milieu stressé

(Gris les souches traitées en blanc par PCZ souche non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

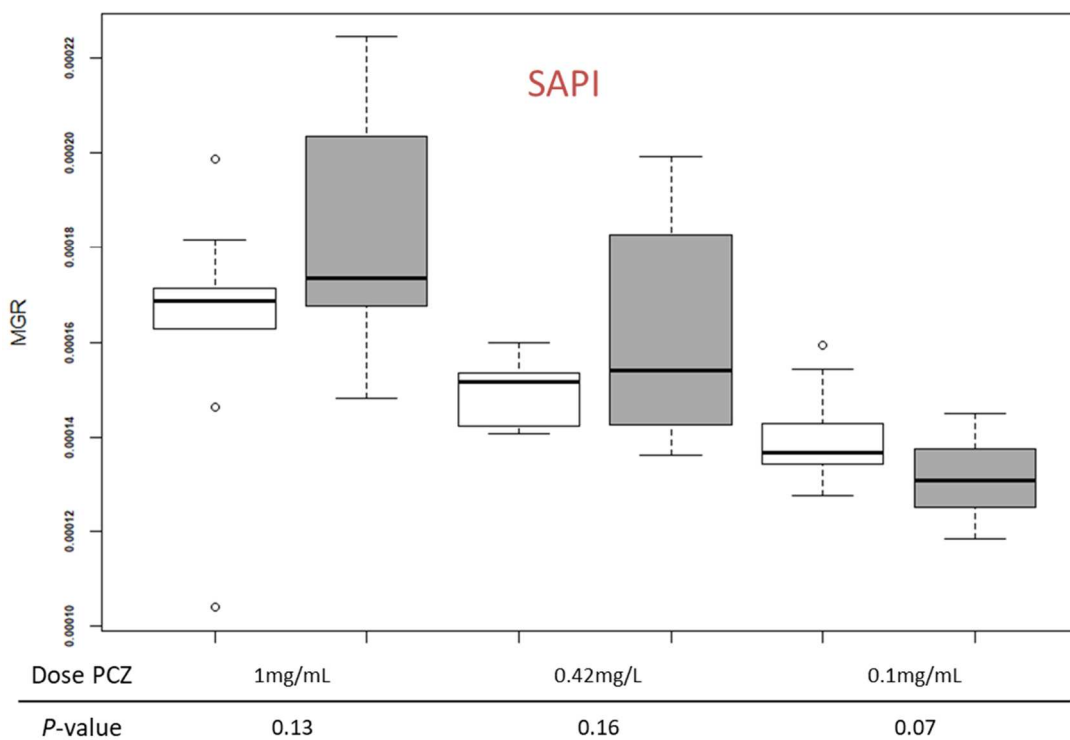


Figure 36. Effet dose du PCZ sur la fitness d'*E. coli* 536 en milieu stressé dont l'effet à dose thérapeutique (0,42 mg/mL)

(Gris les souches traitées par PCZ, en blanc souche non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

#### 4.1.4.4 En milieu sérum-SAPI : évaluations de l'effet de PCZ sur le fitness du panel de souches testé

En présence de PCZ (box plot gris, figure 37), aucun effet n'a été observé sur le MGR de la majorité du panel de souches testé en milieu sérum-SAPI (P-value : >0.05). Les rares souches, pour lesquelles une augmentation (4 et 49) ou une diminution (35 et 57) est significative, n'appartiennent pas au même groupe phylogénétique (respectivement A0 et B1 ; et A1 et B2).

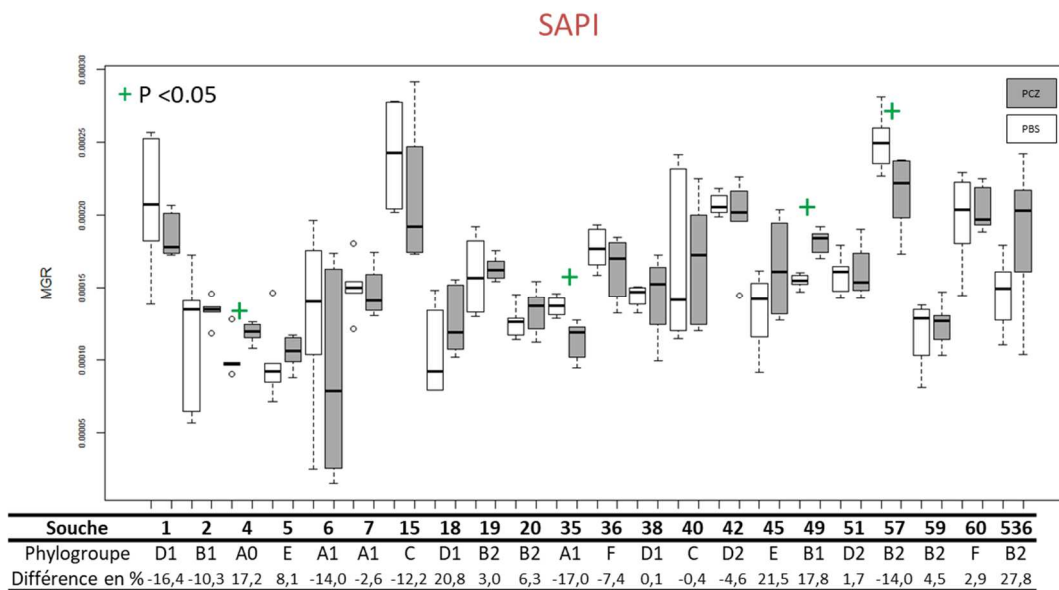


Figure 37. Effet du PCZ sur la fitness du panel de souches testé en milieu riche

(Gris les souches traitées par PCZ, en blanc souches non traitées. N=9, PCZ : Procizumab®, PBS : Phosphate-Buffered Saline)

### 3.1.4.5 Détection d'un DPP3 bactérien par western blot

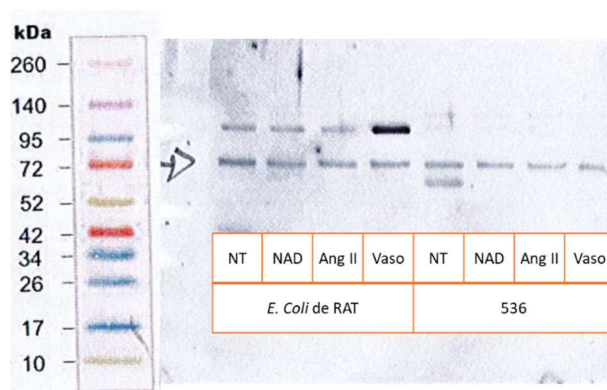


Figure 38. Western blot sur culot bactérien 536 et Rat 4 en présence de ou non de vasopresseurs

(NT : Non traité ; NAD : Noradrénaline ; Ang II : Angiotensine II. Vaso : Vasopressine)

Sur le WB des culots bactériens d'*E.coli* de rat et 536, on peut observer que le PCZ détecte une protéine du même poids moléculaire que la DPP3 humaine (73 kDa). Par ailleurs, on peut noter que pour *E. coli* de rat (B1) il y a une protéine d'un poids moléculaire aux alentours de 100 kDa reconnue par le PCZ. Ceci peut évoquer un potentiel variant de DPP3 pour la souche B1 (figure 38).

### 4.1.4.6 Synthèse des observations pour PCZ

Comme l'avons montré précédemment, la DPP3 d'*E. coli* (*EcDPP3*) semble impliquée dans la croissance bactérienne. Le blocage par le PCZ humanisé de cette DPP3 semble influencer sur la croissance de notre panel bactérien. En effet le taux de croissance en milieu LB est augmenté alors qu'en milieu sérum-SAPI le MGR ne semble pas être influencé par le PCZ ou seulement de manière marginale (tableau 10).



### 3.1.4 Synthèse générale des effets des différents vasopresseurs sur chacune des souches

Tableau 10. Synthèse des effets des différents vasopresseurs sur chacune des souches

SOUCHE	Nom simplifié	SITE	Phylogroupe	O-type	H-type	Souris	ST Warwick	NAD			Ang II			VASO			PCZ		
								LB	SAPI	Urine	LB	SAPI	Urine	LB	SAPI	Urine	LB	SAPI	Urine
NILS01	1	Fèces	D1	O25	H18	10	69	-2	69,8	58,6	1,9	0,8	0,9	11,8	9,4	-16,4			
NILS02	2	Fèces	B1	O173	H23	0	224	0,7	60	352,9	-1,4	-1,2	-0,4	-5,6	4	-10,3			
NILS04	4	Fèces	A0	O9	H4	0	7343	-4,5	66,6	122,5	3,4	-3	0,4	0	10,1	17,2			
NILS05	5	Fèces	E	O169	H9	0	543	-3,6	62,4	62,5	4,8	-5	1,5	1,9	12,7	8,1			
NILS06	6	Fèces	A1	O9	H9	0	10	-3,1	57	132,2	2,4	2,5	-0,5	-8,3	10,7	-14			
NILS07	7	Fèces	A1	O105	H6	10	10	-5,6	59,2	111,5	0,6	-1,9	0,4	-5	0,6	-2,6			
NILS15	15	Fèces	C	Oneg	H12	7	88	-6,2	43,4	97,6	3,9	-2,3	0,6	8,6	10,6	-12,2			
NILS18	18	Sang	D1	O17	H18	10	69	-1,1	46,9	74,8	1,3	-8,1	2,5	16,8	11,4	20,8			
NILS19	19	Sang	B2	O25	H4	10	131	-4,9	56,8	91	3,5	8,3	-0,4	-2,8	8,7	3			
NILS20	20	Sang	B2	O81	H27	4	452	-3,1	66,7	-14,7	3,4	-7,5	1,9	-0,2	8,9	6,3			
NILS35	35	Urine	A1	Oneg	H4	10	4238	-4,8	38	508,1	0,3	2,4	0,7	-6,6	-0,8	-17			
NILS36	36	Urine	F	O1	H7	5	new	-5,7	54,6	35,9	3,6	-6,1	-0,9	6,1	8,7	-7,4			
NILS38	38	Urine	D1	O17	H1	0	501	-5	79	25,3	1,4	4,3	-1,5	-10,1	1,4	0,1			
NILS40	40	Urine	C	Oneg	H12	0	23	-5,9	43,3	495,1	3,1	-1,7	-0,7	12,9	12	-0,4			
NILS42	42	Urine	D2	Oneg	H30	10	38	-6,5	52,5	225,8	0,1	2,2	-1,9	-1,6	15,8	-4,6			
NILS45	45	Urine	E	O137	H41	1	3018	-4,7	72,1	158,5	2,7	-1,5	-1,1	2	1,6	21,5			
NILS49	49	Urine	B1	O9	H11	7	58	-7,4	56,5	293	4,6	-1,6	0,4	7,1	10,8	17,8			
NILS51	51	Urine	D2	O3	H1	2	132	-8	64,7	372,1	-2,9	-1,2	1,6	-1,5	-2,8	1,7			
NILS57	57	Urine	B2	O1	H7	10	95	0	31,9	48,6	3,8	-7,4	-1,2	21	10,9	-14			
NILS59	59	Urine	B2	O6	H1	8	73	-3,6	49,1	299,1	3,3	-3,9	-1,3	4,9	9,2	4,5			
NILS60	60	Urine	F	O33	H4	6	117	-7,4	26,1	141,9	1,3	-4,2	-0,8	9,1	6,7	2,9			
536			B2					-2,9	38,6	207,8	2,6	-5,9	-1,7	4,2	3,3	27,8			



- réduction statistiquement significative  $P < 0,05$
- différence non significative
- augmentation statistiquement significative  $P < 0,05$

(Souche : nom de la souche dans la collection NILS ; SITE : souche collectée dans les selles, sang ou urine ; phylogroupe : groupe phylogénétique ; O-type : antigène somatique O ; H-type : antigène flagellaire H ; souris : nombre de souris sur dix souris décédées après l'inoculation de la souche ; ST: Sequence Type (selon le schéma Warwick))

## 3.2 Evaluation des effets des thérapies du sepsis sur la croissance microbienne *in vivo*

### 3.2.1 Noradrénaline

Seize heures après la CLP, 4 rats avec une FR inférieure à 45% ont été inclus. Après le prélèvement sanguin initial, les rats recevaient la perfusion de NAD (titration débutée par 5 à 10 µg/h) (figure 39).

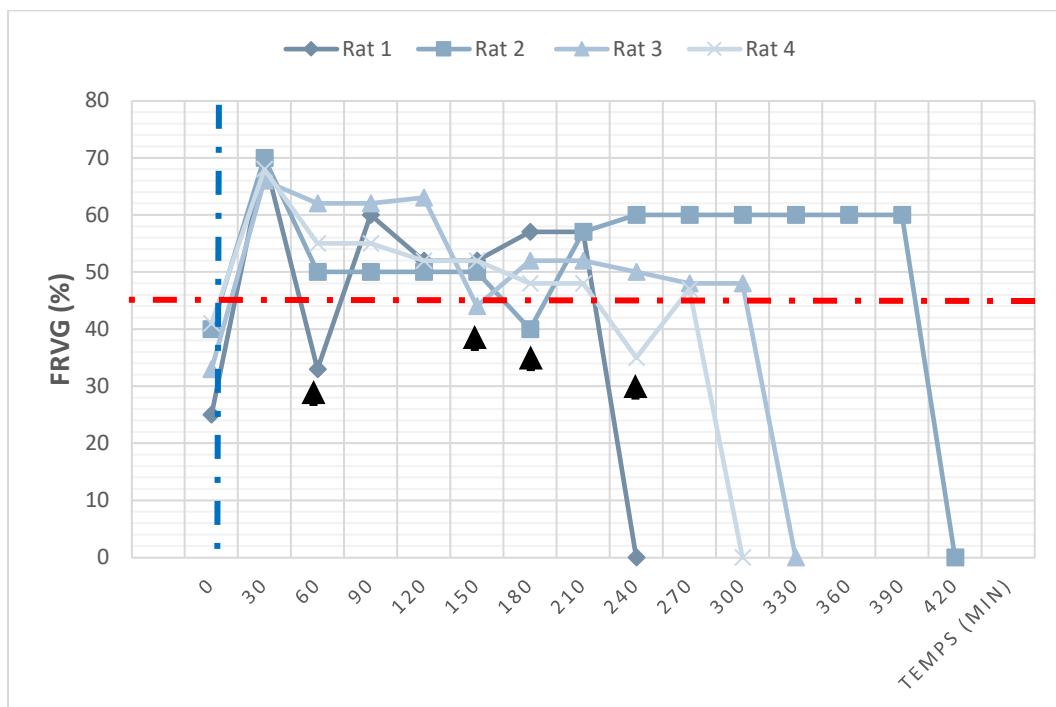


Figure 39. Evolution de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche de rats LPC traités avec de la noradrénaline

(FRVG : fraction de raccourcissement du ventricule gauche ; ▲ : Ajustement de la dose de noradrénaline, ligne pointillée rouge : FR = 45%, Ligne pointillée bleu : début de noradrénaline)

L'efficacité de la NAD était quasi immédiate avec la première mesure de fraction de raccourcissement qui se normalisait (>45%). Pendant les premières minutes, les doses de NAD n'avaient pas besoin d'être ajustées.

Il n'y avait aucun signe d'alerte et l'animal décédait sans aucunes prémices alors que la FR était dans les objectifs quelques minutes auparavant. Les animaux sont tous décédés entre 4h et 7h, une fois l'expérimentation débutée 16h après la LCP, rendant l'analyse microbiologique peu sensible pour retrouver une différence avec le comptage d'UFC. Devant la difficulté à mettre au point un modèle fiable, nous avons stoppé l'expérimentation.

## 4 Discussion & perspectives du travail

### 4.1 Discussion

Dans ce travail, nous avons montré l'absence d'effets sur la fitness d'*E. coli*, en utilisant l'angiotensine II et la vasopressine quel que soit le milieu, contrairement à la noradrénaline dont on confirme les effets (accélération de la croissance). A notre connaissance, c'est la première fois que la croissance bactérienne a été étudiée en présence d'angiotensine II et de vasopressine, en comparaison de la noradrénaline. De plus, les effets du PCZ sur la croissance bactérienne n'ont jamais été étudiés (126). Dans nos résultats, le blocage par PCZ de la DPP3 d'*E. coli* (*EcDPP3*) semble avoir une influence sur la croissance bactérienne. En effet, en milieu standardisé, en LB le Procizumab® le taux de croissance maximal est augmenté alors qu'en milieu sérum-SAPI, dans des conditions de stress, ce MGR ne semble pas affecté chez la majorité des souches.

La noradrénaline en milieu pauvre, comme le sérum-SAPI, augmente la croissance bactérienne. C'est un milieu qui est plus compétitif pour la survie des bactéries, donc plus proche de conditions physiologiques dans un compartiment vasculaire stressé (304). Ce résultat est connu, en ce qui concerne le milieu sérum-SAPI (111), qui est causé par plusieurs mécanismes intriqués dont seulement certains ont été mis en lumière. Cet effet de la

noradrénaline est médié par le système du Quorum Sensing (QS) (112,120) ou par chélation du fer (115), mais ces mécanismes ne sont à ce jour que partiellement connus. Dans la littérature, il n'a pas été rapporté que le MGR était au contraire réduit en milieu nutritif riche chez toutes les souches. Initialement, l'équipe de Lyte et al. avait mis au point ce milieu stressant qu'est le sérum-SAPI, devant l'absence d'effets observés sur la croissance bactérienne par d'autres équipes qui avaient étudié les effets inter-règles des catécholamines dans des milieux classiques de culture (111,304). Le sérum SAPI peut se rapprocher d'environnement auquel une bactérie doit faire face lors d'un processus infectieux débutant.

Cet effet inversé entre milieux riche et stressant était soumis à un effet dose. Il s'observait jusqu'à la concentration thérapeutique pour le milieu SAPI où le MGR ne se différenciait plus au-delà de cette concentration de NAD. En LB la réduction du MGR s'observait jusqu'à des concentrations physiologiques. Il ne semble donc pas y avoir d'effet stimulant sur la croissance bactérienne de la NAD jusqu'à des concentrations physiologiques de cette hormone.

La noradrénaline atténue la production de médiateurs pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène et augmente la production d'IL-10 anti-inflammatoire, à la fois dans les leucocytes humains, chez les souris ou les volontaires sains stimulés par le LPS ou encore chez le patient en choc septique (126,139). En outre, la perfusion de noradrénaline augmente la dissémination bactérienne dans un modèle murin de septicémie polymicrobienne (139). Le vasopresseur alternatif, la vasopressine, n'exerce aucun effet en comparaison. Par conséquent, la NAD peut contribuer à l'immunoparalysie observée chez les patients en choc septique (139). Dans la même lignée, nous avons montré que la vasopressine n'a aucun effet sur la croissance bactérienne, aussi bien dans un milieu riche qu'en milieu stressant. De même, pour l'angiotensine II, il n'y pas d'effet microbiologique mis en évidence.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence l'effet de PCZ sur la croissance bactérienne. Les effets semblaient inversés par rapport à la noradrénaline avec un MGR augmenté en milieu riche mais la fitness ne semblait pas affectée en condition de stress, avec ou sans l'immunothérapie.

Un point fort de ce travail est l'utilisation d'un panel représentatif de l'espèce *E. coli*. La plupart des travaux se base sur des souches d'*E. coli* de laboratoire ou d'isolats cliniques isolés (112,116). Ici, nous avons mis en évidence un effet commun à des souches représentatives de l'espèce *E. coli* pour la noradrénaline et le PCZ, suggérant un effet lié à des gènes communs à toute l'espèce.

L'effet favorisant la croissance bactérienne de la noradrénaline dans le sepsis vient d'être démontré récemment *in vivo* (139). La réserve principale de ce résultat est que l'instauration de la noradrénaline ne correspond pas à la réalité de l'histoire naturelle du sepsis ainsi que de la pratique clinique. La noradrénaline est instaurée dès l'induction du sepsis chez la souris, sans que les signes cliniques du sepsis n'apparaissent. Nous avons essayé de mettre en place un modèle pré-clinique qui soit en adéquation avec la réalité clinique mais notre modèle est beaucoup trop sévère une fois le choc septique avec défaillance cardiaque en place.

Il y a plusieurs limites à notre travail, la première est l'utilisation de milieux de culture « synthétiques », ce qui n'est pas complètement semblable à des fluides humains. Le calcul du MGR est une façon d'évaluer la valeur sélective qui peut être discutable, mais c'est une méthode simple et qui peut être réalisée à grande échelle. En effet, peu d'approches simples permettraient la détermination de la fitness pour 23 souches, pour 4 molécules, dans 3 milieux, en 9 réplicats, soit 2484 mesures que nous avons réalisées. Une autre limite de notre étude est l'absence de données dans un modèle *in vivo*. Il aurait fallu une phase de mise au

point de notre modèle animal, afin de moduler la sévérité du sepsis, pour que l'animal soit en défaillance vasculaire sans avoir de cardiomyopathie septique associée. Enfin, parmi les bactéries mises en évidence dans notre modèle animal, nous n'avons pas étudié les effets sur *Enterococcus faecalis* ou *Enterobacter cloacae* qui étaient les deux autres principales bactéries identifiées dans les hémocultures. Nous avons pu mettre en évidence par Western Blot un DPP3 d'*E. coli* (EcDPP3) avec PCZ qui est du même poids moléculaire que le DPP3 humain. Il faudra que cette découverte soit confirmée par analyse bio-informatique du génome d'*E. coli*.

#### 4.1 Perspectives

Dans notre étude, nous avons volontairement fait le choix de nous focaliser sur l'espèce *E. coli*, car c'est à la fois la bactérie la plus fréquemment impliquée dans le sepsis humain et c'est une bactérie bien maîtrisée au laboratoire sur les différentes facettes expérimentales. Les effets de cet ensemble de traitements symptomatiques du sepsis pourraient être étudiés sur d'autres bactéries afin d'évaluer si les effets observés chez *E. coli* sont semblables chez d'autres bactéries fréquemment identifiées dans le sepsis.

Afin d'expliquer la mécanistique des effets de PCZ et de NAD sur *E. coli* 536, nous envisageons une analyse protéomique en présence de NAD et PCZ en milieu LB et sérum-SAPI. Les effets sur la croissance bactérienne étant les plus marqués avec ces thérapeutiques, il semble licite de débiter par ces conditions. *E. coli* 536 est une souche de laboratoire typique de l'espèce et son génome a été parfaitement séquencé. On pourrait avoir une idée des niveaux d'expression des protéines en fonction des agents extérieurs (traitements, facteurs environnementaux...). Cette approche devrait permettre d'identifier les voies métaboliques impliquées dans les différences de fitness observés et apporter une explication mécanistique.

La perspective plus lointaine serait l'identification d'un gène codant *EcDPP3* dans les génomes d'*E. coli* par bio-informatique. En pratique, la majorité des approches d'annotation de gènes repose sur des comparaisons de séquences simples. D'autres approches, basées sur la présence de certains motifs protéiques ou de prédictions de structure tertiaire, permettraient une exploration plus complète de la détection d'un gène putatif codant *EcDPP3*.

Nous pourrions ensuite créer un mutant *knock-out* pour *EcDPP3* par CRISPR-cas9 et reconstituer cette souche avec le gène délété, afin de valider les effets d' *EcDPP3* et du PCZ observés dans nos résultats. Enfin, nous pourrions également évaluer les effets physiologiques de *EcDPP3* dans un modèle murin sain et dans un modèle de sepsis murin.

#### 4.2 Conclusion

Les vasopresseurs sont essentiels dans la prise en charge du sepsis. Contrairement à la noradrénaline, la vasopressine et l'angiotensine II n'ont pas d'effet sur la croissance bactérienne, que ce soit en milieu riche ou stressant. Le PCZ semble avoir un effet sur la croissance bactérienne et en particulier en milieu riche. Ces résultats doivent être confirmés dans un modèle animal. Les mécanismes physiopathologiques de ces effets observés doivent être explorés

## Discussion et perspectives générales



## 1. Discussion générale

Le sepsis est défini par la survenue de défaillance d'organe et en particulier cardio-vasculaire nécessitant un traitement symptomatique par vasopresseurs. Ces traitements de support d'organes donnent le temps au traitement étiologique, antibiothérapie associée ou non à la chirurgie, d'agir. Le vasopresseur de première intention de la défaillance vasculaire liée au sepsis est la noradrénaline dont les effets ont été étudiés depuis environ 30 ans. Elle présente néanmoins des effets délétères sur les plans cardio-vasculaire (nécrose cardiomyocytaire ou vasoconstriction (127,128,295)), immunologique (immunoparalysie (82,126)) et microbiologique (accélération de la croissance bactérienne (111,120,321)). Ainsi, des alternatives ont été proposées ou sont en cours de développement, dont la vasopressine et l'angiotensine II. A ce jour, les effets microbiologiques de ces alternatives thérapeutiques ne sont pas connus.

### Intérêt d'un modèle préclinique compatible avec l'histoire naturelle du sepsis.

Tous processus pathologiques confondus, les études précliniques sont fondamentales afin d'améliorer la prise en charge médicale. Elles permettent d'améliorer, à condition de respecter l'évolution naturelle des mécanismes physiopathologiques connus, la compréhension de la maladie, tester de nouvelles hypothèses physiopathologiques et de nouvelles thérapeutiques. Les recommandations de 2018 sur la qualité minimale des modèles de sepsis incitent à se calquer sur la pratique clinique (279). Utiliser un modèle de sepsis animal sans utiliser d'antibiotiques n'est pas pertinent sur le plan clinique (322). Il en est de même de l'utilisation prophylactique d'antibiotiques.

Lors de la prise en charge du sepsis chez l'Homme, l'identification de l'agent pathogène est une étape primordiale. Nous avons identifié les bactéries les plus fréquentes de notre modèle animal de ligature ponction cœcale (LPC) chez le rat. En plus d'identifier les germes au préalable, l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) permet de cibler le meilleur antibiotique (323). Les antibiotiques doivent être adaptés aux germes et au site d'infection mais aussi à l'animal. Cela nous a permis de proposer une alternative à l'imipénème qui n'est pas adapté au rat car considéré comme un antibiotique critique en médecine vétérinaire avec un risque d'antibiorésistance. Selon nos résultats, le cotrimoxazole ou la lévofloxacine pourraient être utilisés pour nos futures expérimentations. L'antibiothérapie doit être mise en place dès la reconnaissance des signes cliniques. Pour les modèles animaux, les recommandations préconisent une durée minimale de 12h après l'induction du sepsis, avant l'instauration des antibiotiques et du remplissage vasculaire. Ce délai est considéré comme un temps suffisamment long pour observer l'apparition de défaillances d'organes (290,324). Cette réanimation plus tardive permet de reproduire plus fidèlement les caractéristiques pathologiques du sepsis. Cela permet aussi un maintien prolongé du syndrome avec une survie plus élevée dans un modèle murin de septicémie sévère (324).

Une distinction est faite pour les modèles associés à une létalité importante, conduisant à l'apparition plus précoce et une progression plus rapide du sepsis par rapport à l'Homme. Ces contextes rendent difficile la recommandation des points de repères fixes pour l'instauration des antibiotiques chez l'animal. Leurs introductions, concomitamment à l'apparition des signes cliniques de sepsis, semblent l'approche la plus pertinente cliniquement.

#### Etude des effets des vasopresseurs sur la croissance bactérienne

Parmi les vasopresseurs du sepsis, les effets paradoxaux de la noradrénaline sont les plus étudiés, que ce soit sur le plan cardio-vasculaire (127,128), immunologique (82,126), ou microbiologique (111,120,321).

L'hypothèse des effets des vasopresseurs stimulant la croissance bactérienne a été émise pour la première fois à la fin des années 40 (110). Les effets de la noradrénaline sur la croissance semblent médiés via le Quorum sensing (120) et par la chélation en fer (115). Les effets ont été majoritairement mis en évidence *in-vitro* (126) à l'aide d'un milieu pauvre en nutriment le sérum-SAPI (304), afin de mimer les conditions de stress auxquelles peut être soumise la bactérie dans un compartiment physiologique. De nombreuses bactéries sont sensibles aux effets de la noradrénaline, qu'elles soient gram positif ou gram négatif (304). Il y a peu d'études des effets microbiologiques *in vivo* (139,325). Ces rares études utilisent des modèles murins qui ne reflètent pas l'histoire naturelle du sepsis, de l'initiation de l'infection, en passant par le début du sepsis jusqu'à la nécessité d'introduire un support cardio-vasculaire. Les alternatives, telles que la vasopressine, actuellement recommandée (10,81), ou l'angiotensine II, en cours d'exploration (27,88), ont permis de réduire les doses de noradrénaline, tout en maintenant les objectifs de pression artérielle lors de choc réfractaire. Ou encore, des biothérapies adjuvantes, comme le Procizumab®, sont en cours de développement.

Sur le même principe, nous avons exploré les effets microbiologiques de ces trois autres options thérapeutiques afin de les comparer à la noradrénaline. En utilisant un panel représentatif d'*E. coli*, qui est très souvent impliqué dans le sepsis chez l'Homme, nous avons montré des effets des différents vasopresseurs sur la croissance bactérienne. Que ce soit en milieu riche ou en milieu stressant, cet effet est neutre en ce qui concerne l'angiotensine II et la vasopressine. La noradrénaline, quant à elle, stimule la croissance bactérienne dans des

conditions de stress et réduit la croissance dans un milieu riche. De manière intéressante, l'usage du PCZ augmente le taux de croissance maximal dans un milieu riche alors qu'il a peu d'effets en milieu pauvre. Nous avons par ailleurs mis en évidence un analogue de la DPP3 chez *E. coli* par western blot. L'influence qu'exerce le PCZ sur la croissance bactérienne indiquerait que cette *EcDPP3* pourrait être impliquée dans le métabolisme d'*E. coli*.

Sur le plan clinique, ces résultats impliquent que dans des conditions de stress, la dissémination bactérienne peut-être plus importante en présence de noradrénaline. En particulier lorsque la source d'infection n'est pas contrôlée en aggravant simultanément les facteurs de virulence et la capacité bactérienne à se reproduire (111,120). C'est le cas dans les infections intra-abdominales où le traitement est chirurgical ou endoscopique ou encore en cas d'antibiorésistance bactérienne. En plus de cette dissémination bactérienne l'immunoparalysie du sepsis va être polarisée par la noradrénaline en faveur des cytokines anti-inflammatoires impliquant une aggravation de cette paralysie du système immunitaire (126,137,138). Enfin, la dysfonction cardio-vasculaire peut-être aggravée par la NAD. En effet, la défaillance vasculaire liée au sepsis, impliquant une dysfonction du système rénine angiotensine (25,26) et endothéliale, sera aggravée par la vasoconstriction induite par la NAD (28). Ainsi que la cardiomyopathie septique induite, le relargage des DAMPS et PAMPS (326), produits des dégradations des bactéries, d'autant plus importantes que la charge bactérienne sera importante. Il semble donc y avoir une intrication entre les 3 phénomènes dans la mise en place du sepsis qui peuvent donc potentiellement être aggravés par la NAD (figure 40).

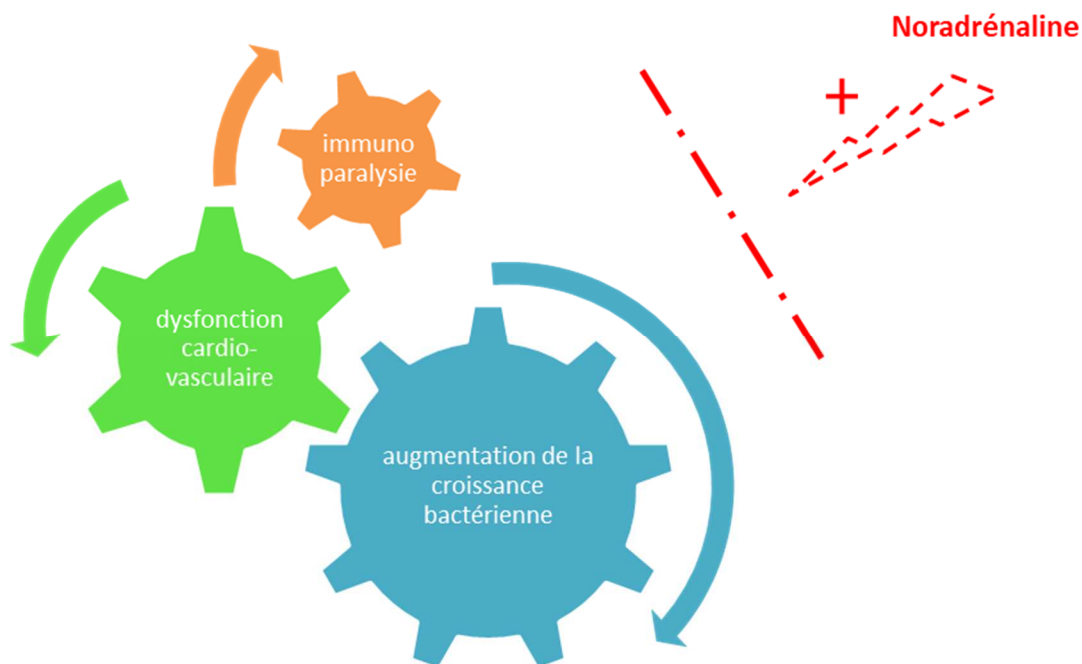


Figure 40. Phénomènes intriqués dans le sepsis impliqués dans la défaillance d'organe pouvant être aggravés par la noradrénaline

Cette implication de la noradrénaline dans la potentielle aggravation du sepsis incite à l'utilisation d'alternatives thérapeutiques de manière plus précoce sans attendre la survenue d'un choc réfractaire (81,88).

La limitation principale de notre travail est l'absence de données animales qui auraient permis de confirmer les résultats *in vitro*, toujours dans le souci de se rapprocher le plus possible de l'évolution du processus de la pathologie. Cette limitation a été partiellement compensée par l'exploration d'une bactérie très impliquée dans le sepsis humain : *E. coli* et l'usage d'un panel large ainsi que des milieux caractéristiques de compartiments physiologiques.

Au regard de ces observations de nombreuses perspectives peuvent être discutées.

## 2. Perspectives générales

1/ La première étape sur le plan expérimental serait de mettre au point un modèle animal permettant d'évaluer les effets microbiens des différents vasopresseurs. La LPC demeure le modèle le plus pertinent mimant la clinique avec l'impossibilité de contrôler l'inoculum. De plus, la sévérité du modèle peut être modulée (290). L'antibiothérapie et le remplissage vasculaire se feront au bout des 12h après la LPC, comme recommandé (322). La meilleure façon de détecter la défaillance vasculaire, sans attendre la cardiomyopathie septique, serait de faire une surveillance par télémétrie continue de la pression artérielle. La finesse de ce monitoring permettrait d'éviter la survenue de la cardiomyopathie septique qui suit fréquemment la dysfonction vasculaire et augmente de 2 à 3 fois le taux de mortalité (37,38). Par ailleurs, le vasopresseur ou la solution saline seront administrés par pompe micro-osmotique dans la veine jugulaire afin que l'animal soit le plus libre possible pour réduire son stress et éviter ainsi les injections itératives d'anesthésiques.

Le protocole nécessitera 5 bras (figure 41) : 1) NAD + antibiothérapie, 2) VASO + antibiothérapie, 3) AngII + antibiothérapie, 4) PCZ + antibiothérapie, 5) Solution saline + antibiothérapie. Cette étape aurait nécessité plusieurs semaines de mise au point ainsi que la maîtrise de nouvelles techniques telles que la télémétrie.

A la fin de la procédure, les animaux étaient sacrifiés et les prélèvements de sang (EDTA + hépariné), urine, ascite, organes (cœur, poumon, rate, rein, foie) étaient réalisés. Un étalement de 4 dilutions par liquide biologique et d'organe (de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ), soit 16 boîtes de pétri au total, était réalisé pour le comptage d'UFC. Les échantillons d'organes, une fois pesés, étaient préalablement homogénéisés dans 1 mL de sérum physiologique grâce à un Broyeur à billes (TissueLyser II™ QIAGEN®) avant la mise en culture de 100µL de broyat par gélose.

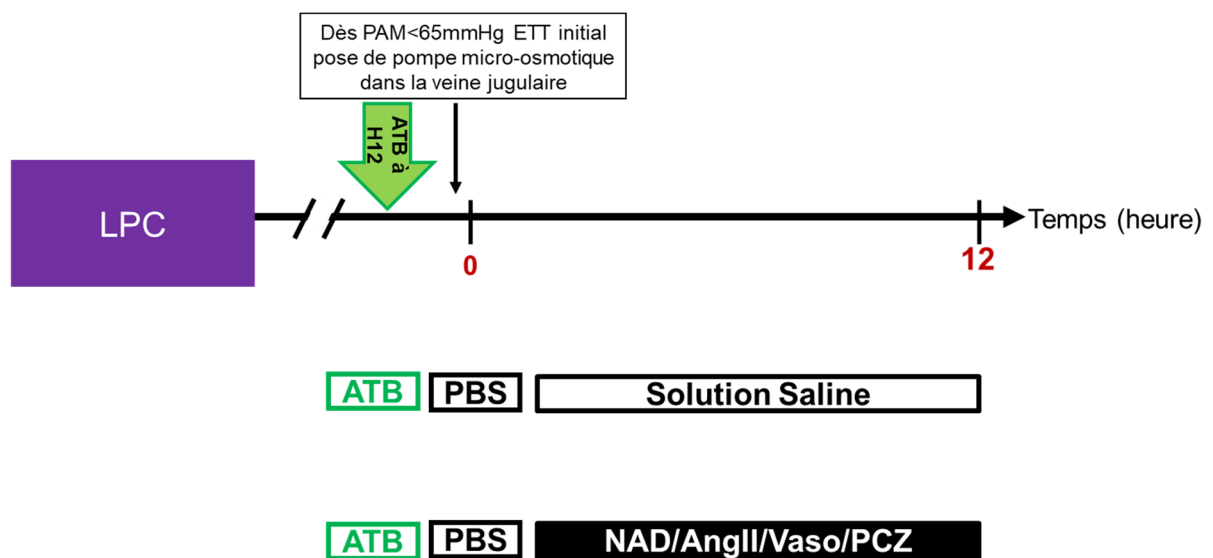


Figure 41. Nouveau protocole expérimental évaluant les effets de la noradrénaline, de l'angiotensine II, de la vasopressine et du PCZ sur la croissance bactérienne *in vivo*

(LPC : ligature ponction caecale ; ETT : échographie transthoracique ; PBS : Phosphate Buffered Saline ; NAD : noradrénaline ; Ang II : angiotensine II ; VASO : vasopressine ; PCZ : Procizumab®, ATB : antibiotique)

2/ Afin de comprendre la mécanistique des effets de PCZ et de NAD sur *E. coli* 536, une analyse protéomique, en présence de NAD et PCZ en milieu LB et sérum-SAPI avec, comme contrôle, la vasopressine pourrait être envisagée. Les effets sur la croissance bactérienne étant les plus marqués avec ces thérapeutiques, il semble licite de débiter par ces conditions. *E. coli* 536 est une souche de laboratoire typique de l'espèce et son génome a été parfaitement séquencé. Un aperçu des niveaux d'expression des protéines en fonction des agents extérieurs (traitements, facteurs environnementaux...) pourrait être obtenu. Cette approche devrait permettre d'identifier les voies métaboliques impliquées dans les différences de fitness observées et apporter une explication mécanistique. Des protéines produites spécifiquement par des gènes codant pour les facteurs de virulence ou de résistances pourraient être mises en évidence. Ou encore dans la production de peptides impliqués dans la voie de signalisation, comme les auto-inducteurs (AI) qui ont un rôle dans la communication entre les micro-

organismes appelée Quorum sensing. Concernant l'implication d'*EcDPP3* dans la croissance bactérienne, les voies métaboliques inconnues à ce jour pourraient être explorées pour la première fois.

### 3/ Sur le plan microbiologique

L'effet de la NAD est maintenant établi sur la croissance bactérienne, la virulence, la formation du biofilm etc... Ce qui demeure inconnu est l'impact des vasopresseurs sur l'expression de la résistance aux antibiotiques d'*E. coli*. L'exploration peut être faite par l'observation du niveau d'expression des porines ou de la céphalosporinase d'*E. coli*, après culture en présence de vasopresseurs en milieu LB ou sérum-SAPI. Ou plus simplement par le comptage d'UFC de cultures d'*E. coli* soumises à des vasopresseurs en présence de doses sub-inhibitrices d'antibiotiques.

### 4/ Sur le plan clinique

Par un essai randomisé contrôlé de non infériorité, la survie des patients en choc septique, comparant un groupe traité par une bithérapie vasopressive par NAD + Ang II d'emblée à des patients recevant de la NAD seule, pourrait être observée. Les études actuelles avec la vasopressine et l'angiotensine II ont été réalisées une fois un choc réfractaire diagnostiqué. Le but étant de limiter les effets paradoxaux de la NAD tout en gardant au maximum ses effets thérapeutiques utiles.

Une évaluation en temps réel de la charge bactérienne par hémocultures répétées pourrait être envisagée chez ces patients sur les 24-48 premières heures afin de comparer la charge bactérienne chez les patients avec NAD + Ang II et les patients avec NAD seule. Les hémocultures positives serontensemencées sur gélose et le critère de jugement principal étant la différence de la moyenne de CFU dénombré entre chaque groupe.



## Conclusion générale

## Conclusion Générale

Dans cette thèse, nous avons mis l'accent sur l'importance du modèle pré-clinique fidèle à la réalité clinique afin de pouvoir répondre à une question scientifique. Nous avons montré la nécessité de trouver des alternatives à la noradrénaline qui possède des effets paradoxaux qui peuvent être délétères à long terme. Contrairement à la NAD et au PCZ, la VASO et l'AngII n'ont pas d'effets sur la croissance bactérienne d'*E. coli in vitro*. Finalement, une nouvelle voie métabolique impliquée dans la croissance bactérienne induite par *EcDPP3* a été mise en évidence mais reste à confirmer. Ces résultats doivent être confirmés dans un modèle animal et les mécanismes physiopathologiques explorés.

## Bibliographie

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *CHEST*. 1992 Jun 1;101(6):1644–55.
2. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016 May 23;353:i1585.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
4. 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*. 1992 Jun;20(6):864–74.
5. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):707–10.
6. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*. 2018 Jul 7;392(10141):75–87.
7. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200–11.
8. Adhikari NKJ, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010 Oct 16;376(9749):1339–46.
9. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303–10.
10. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017 Mar;43(3):304–77.
11. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2012 Dec;12(12):919–24.
12. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA*. 2014 Jul 2;312(1):90–2.
13. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013 21;369(21):2063.

14. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*. 2011 Nov;140(5):1223–31.
15. du Cheyron D, Lesage A, Daubin C, Ramakers M, Charbonneau P. Hyperreninemic hypoaldosteronism: a possible etiological factor of septic shock-induced acute renal failure. *Intensive Care Med*. 2003 Oct;29(10):1703–9.
16. Boldt J, Papsdorf M, Kumle B, Piper S, Hempelmann G. Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on endothelial-derived substances in the critically ill. *Crit Care Med*. 1998 Oct;26(10):1663–70.
17. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension*. 2001 Aug;38(2):177–82.
18. Dunn CW, Horton JW. Role of angiotensin II in neonatal sepsis. *Circ Shock*. 1993 Jun;40(2):144–50.
19. Hilgenfeldt U, Kienapfel G, Kellermann W, Schott R, Schmidt M. Renin-angiotensin system in sepsis. *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9(8–9):1493–504.
20. Cumming AD, Driedger AA, McDonald JW, Lindsay RM, Solez K, Linton AL. Vasoactive hormones in the renal response to systemic sepsis. *Am J Kidney Dis*. 1988 Jan;11(1):23–32.
21. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, 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*. 2004 Aug;8(4):R204-212.
22. Aneman A, Bengtsson J, Snygg J, Holm M, Pettersson A, Fändriks L. Differentiation of the peptidergic vasoregulatory response to standardized splanchnic hypoperfusion by acute hypovolaemia or sepsis in anaesthetized pigs. *Acta Physiol Scand*. 1999 Aug;166(4):293–300.
23. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. 1993 May 20;328(20):1471–7.
24. Fox GA, Paterson NA, McCormack DG. Effect of inhibition of NO synthase on vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis. *Am J Physiol*. 1994 Oct;267(4 Pt 2):H1377-1382.
25. Bucher M, Hobbhahn J, Kurtz A. Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. *Crit Care Med*. 2001 Sep;29(9):1750–5.
26. Salgado DR, Rocco JR, Silva E, Vincent J-L. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach? *Expert Opin Ther Targets*. 2010 Jan;14(1):11–20.

27. Bellomo R, Forni LG, Busse LW, McCurdy MT, Ham KR, Boldt DW, et al. Renin and Survival in Patients Given Angiotensin II for Catecholamine-Resistant Vasodilatory Shock. A Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Nov 1;202(9):1253–61.
28. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock*. 2016 Mar;45(3):259–70.
29. Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med*. 2011 Jun 22;3(88):88ps25.
30. Newton CR, Curran B, Victorino GP. Angiotensin II type 1 receptor activation increases microvascular permeability via a calcium dependent process. *J Surg Res*. 2005 Jan;123(1):33–9.
31. Iba T, Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019;17(2):283–94.
32. Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, Sherwin RL, Reynolds CA, Abidov A, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. *Crit Care [Internet]*. 2018 May 4 [cited 2021 Jun 4];22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5934857/>
33. Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Jun;18(6):424–34.
34. Weisel RD, Vito L, Dennis RC, Valeri CR, Hechtman HB. Myocardial depression during sepsis. *Am J Surg*. 1977 Apr;133(4):512–21.
35. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*. 1984 Apr;100(4):483–90.
36. Beesley SJ, Weber G, Sarge T, Nikravan S, Grissom CK, Lanspa MJ, et al. Septic Cardiomyopathy. *Crit Care Med*. 2018 Apr;46(4):625–34.
37. Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care*. 2009 Oct;15(5):392–7.
38. Kakihana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care*. 2016;4:22.
39. Manovel A, Dawson D, Smith B, Nihoyannopoulos P. Assessment of left ventricular function by different speckle-tracking software. *Eur J Echocardiogr*. 2010 Jun;11(5):417–21.
40. Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR. Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol*. 2011;17:48–85.
41. Bruni FD, Komwatana P, Soulsby ME, Hess ML. Endotoxin and myocardial failure: role of the myofibril and venous return. *Am J Physiol*. 1978 Aug;235(2):H150-156.

42. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*. 1986 Apr;73(4):637–44.
43. Levy RJ, Piel DA, Acton PD, Zhou R, Ferrari VA, Karp JS, et al. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12):2752–6.
44. Siddiqui Y, Crouser ED, Raman SV. Nonischemic myocardial changes detected by cardiac magnetic resonance in critical care patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Oct 15;188(8):1037–9.
45. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care*. 2015;3:48.
46. Madorin WS, Rui T, Sugimoto N, Handa O, Cepinskas G, Kvietys PR. Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC. *Circ Res*. 2004 Apr 16;94(7):944–51.
47. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*. 2007 Jun;35(6):1599–608.
48. Celes MRN, Torres-Dueñas D, Malvestio LM, Blefari V, Campos EC, Ramos SG, et al. Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. *Lab Invest*. 2010 Apr;90(4):531–42.
49. Bernardin G, Strosberg AD, Bernard A, Mattei M, Marullo S. Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. *Intensive Care Med*. 1998 Dec;24(12):1315–22.
50. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. 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*. 1985 Oct;76(4):1539–53.
51. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*. 1989 Aug 3;321(5):280–7.
52. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parrillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest*. 1991 Jan;99(1):169–75.
53. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):949–58.
54. Mebazaa A. Are platelets a ‘forgotten’ source of sepsis-induced myocardial depressing factor(s)? *Crit Care*. 2008;12(1):110.
55. Reilly JM, Cunnion RE, Burch-Whitman C, Parker MM, Shelhamer JH, Parrillo JE. A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and

- peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest*. 1989 May;95(5):1072–80.
56. Sagher U, Rosen H, Sarel O, Becker Y. Studies on a pancreatic cardiodepressant factor. *Circ Shock*. 1986;19(3):319–27.
  57. Benassayag C, Christeff N, Auclair MC, Vernimmen C, Carli-Vielle C, Nunez E, et al. Early released lipid-soluble cardiodepressant factor and elevated oestrogenic substances in human septic shock. *Eur J Clin Invest*. 1984 Aug;14(4):288–94.
  58. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, et al. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5):2314–9.
  59. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
  60. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):1–5.
  61. Alhamdi Y, Abrams ST, Cheng Z, Jing S, Su D, Liu Z, et al. Circulating Histones Are Major Mediators of Cardiac Injury in Patients With Sepsis. *Crit Care Med*. 2015 Oct;43(10):2094–103.
  62. Zhang C, Mo M, Ding W, Liu W, Yan D, Deng J, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) impaired cardiac excitation-contraction coupling by enhancing the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca(2+) leak through TLR4-ROS signaling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Sep;74:260–73.
  63. Wang H, Ward MF, Sama AE. NOVEL HMGB1-INHIBITING THERAPEUTIC AGENTS FOR EXPERIMENTAL SEPSIS. *Shock*. 2009 Oct;32(4):348–57.
  64. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783–801.
  65. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805–20.
  66. Martin L, Schmitz S, De Santis R, Doemming S, Haase H, Hoeger J, et al. Peptide 19-2.5 inhibits heparan sulfate-triggered inflammation in murine cardiomyocytes stimulated with human sepsis serum. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127584.
  67. Martin L, Peters C, Schmitz S, Moellmann J, Martincuks A, Heussen N, et al. Soluble Heparan Sulfate in Serum of Septic Shock Patients Induces Mitochondrial Dysfunction in Murine Cardiomyocytes. *Shock*. 2015 Dec;44(6):569–77.
  68. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 15;167(4):570–9.

69. Watts JA, Kline JA, Thornton LR, Grattan RM, Brar SS. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Jan;36(1):141–50.
70. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014 Jan 1;5(1):66–72.
71. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002 Jul 20;360(9328):219–23.
72. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Medicine.* 2018 Jun;44(6):925–8.
73. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 Jun;34(6):1589–96.
74. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014 Aug;42(8):1749–55.
75. Zhang D, Micek ST, Kollef MH. Time to Appropriate Antibiotic Therapy Is an Independent Determinant of Postinfection ICU and Hospital Lengths of Stay in Patients With Sepsis. *Crit Care Med.* 2015 Oct;43(10):2133–40.
76. Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, et al. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Med.* 2009 May;35(5):871–81.
77. Iscimen R, Cartin-Ceba R, Yilmaz M, Khan H, Hubmayr RD, Afessa B, et al. Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: an observational cohort study. *Crit Care Med.* 2008 May;36(5):1518–22.
78. Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jiménez R, Barroso S, et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Crit Care.* 2006;10(4):R111.
79. Payen D, de Pont AC, Sakr Y, Spies C, Reinhart K, Vincent JL, et al. A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. *Crit Care.* 2008;12(3):R74.
80. Monnet X, Marik PE, Teboul J-L. Prediction of fluid responsiveness: an update. *Ann Intensive Care.* 2016 Dec;6(1):111.
81. Russell JA, Walley KR, Singer J, Gordon AC, Hébert PC, Cooper DJ, et al. Vasopressin versus Norepinephrine Infusion in Patients with Septic Shock. *New England Journal of Medicine.* 2008 Feb 28;358(9):877–87.



82. Bauer-Dörries A, De Cupis S, Liaudet L. [Potential role of norepinephrine in the immune dysfunction associated with sepsis]. *Rev Med Suisse*. 2017 Jul 12;13(569):1350–3.
83. Delmas A. Vasopressine et analogues. In p. 11.
84. Holloway GA, Frederickson EL. Dobutamine, a new beta agonist. *Anesth Analg*. 1974 Aug;53(4):616–23.
85. Nieminen MS, Fruhwald S, Heunks LMA, Suominen PK, Gordon AC, Kivikko M, et al. Levosimendan: current data, clinical use and future development. *Heart Lung Vessel*. 2013;5(4):227–45.
86. Gordon AC, Perkins GD, Singer M, McAuley DF, Orme RML, Santhakumaran S, et al. Levosimendan for the Prevention of Acute Organ Dysfunction in Sepsis. *N Engl J Med*. 2016 27;375(17):1638–48.
87. Chang W, Xie J-F, Xu J-Y, Yang Y. Effect of levosimendan on mortality in severe sepsis and septic shock: a meta-analysis of randomised trials. *BMJ Open*. 2018 30;8(3):e019338.
88. Khanna A, English SW, Wang XS, Ham K, Tumlin J, Szerlip H, et al. Angiotensin II for the Treatment of Vasodilatory Shock. *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 3;377(5):419–30.
89. Wakefield BJ, Sacha GL, Khanna AK. Vasodilatory shock in the ICU and the role of angiotensin II: Current Opinion in Critical Care. 2018 Aug;24(4):277–85.
90. Blet A, Deniau B, Geven C, Sadoune M, Caillard A, Kounde P-R, et al. Adrenergic antibody, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats. *Intensive Care Med Exp*. 2019 May 15;7(1):25.
91. Hippenstiel S, Witzernath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, et al. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res*. 2002 Oct 4;91(7):618–25.
92. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrueck B, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzernath M, et al. Perturbation of endothelial junction proteins by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochem Cell Biol*. 2006 Sep;126(3):305–16.
93. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, Dávid I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, et al. Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med*. 2007 Apr;33(4):703–10.
94. Geven C, Kox M, Pickkers P. Adrenomedullin and Adrenomedullin-Targeted Therapy As Treatment Strategies Relevant for Sepsis. *Front Immunol*. 2018;9:292.
95. Marino R, Struck J, Maisel AS, Magrini L, Bergmann A, Di Somma S. Plasma adrenomedullin is associated with short-term mortality and vasopressor requirement in patients admitted with sepsis. *Crit Care*. 2014 Feb 17;18(1):R34.

96. Caironi P, Latini R, Struck J, Hartmann O, Bergmann A, Maggio G, et al. Circulating Biologically Active Adrenomedullin (bio-ADM) Predicts Hemodynamic Support Requirement and Mortality During Sepsis. *Chest*. 2017;152(2):312–20.
97. Nishio K, Akai Y, Murao Y, Doi N, Ueda S, Tabuse H, et al. Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 1997 Jun;25(6):953–7.
98. Struck J, Hein F, Karasch S, Bergmann A. Epitope specificity of anti-Adrenomedullin antibodies determines efficacy of mortality reduction in a cecal ligation and puncture mouse model. *Intensive Care Med Exp*. 2013 Dec;1(1):22.
99. Wagner K, Wachter U, Vogt JA, Scheuerle A, McCook O, Weber S, et al. Adrenomedullin binding improves catecholamine responsiveness and kidney function in resuscitated murine septic shock. *Intensive Care Med Exp*. 2013 Dec;1(1):21.
100. Geven C, Peters E, Schroedter M, Struck J, Bergmann A, McCook O, et al. Effects of the Humanized Anti-Adrenomedullin Antibody Adrecizumab (HAM8101) on Vascular Barrier Function and Survival in Rodent Models of Systemic Inflammation and Sepsis. *Shock*. 2018 Jan 10;
101. Mebazaa A, Geven C, Hollinger A, Wittebole X, Chousterman BG, Blet A, et al. Circulating adrenomedullin estimates survival and reversibility of organ failure in sepsis: the prospective observational multinational Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1 (AdrenOSS-1) study. *Critical Care*. 2018 Dec 21;22(1):354.
102. Geven C, Blet A, Kox M, Hartmann O, Scigalla P, Zimmermann J, et al. A double-blind, placebo-controlled, randomised, multicentre, proof-of-concept and dose-finding phase II clinical trial to investigate the safety, tolerability and efficacy of adrecizumab in patients with septic shock and elevated adrenomedullin concentration (AdrenOSS-2). *BMJ Open*. 2019 Feb 19;9(2):e024475.
103. Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *The FEBS Journal*. 2011 Sep 1;278(18):3256–76.
104. Deniau B, Rehfeld L, Santos K, Dienelt A, Azibani F, Sadoune M, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. *Eur J Heart Fail*. 2019 Aug 31;
105. Jha S, Taschler U, Domenig O, Poglitsch M, Bourgeois B, Pollheimer M, et al. Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. *J Biol Chem*. 2020 Oct 2;295(40):13711–23.
106. Pang X, Shimizu A, Kurita S, Zankov DP, Takeuchi K, Yasuda-Yamahara M, et al. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. *Hypertension*. 2016;68(3):630–41.
107. Takagi K, Miró Ò, Gayat E, Llorens P, Wussler DN, Čerlinskaitė K, et al. Safety of diuretic administration during the early management of dyspnea patients who are not finally diagnosed with acute heart failure. *European Journal of Emergency Medicine*

[Internet]. 2020 Apr 13 [cited 2021 Jan 29]; Publish Ahead of Print. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/MEJ.0000000000000695>

108. Dépret F, Amzallag J, Pollina A, Fayolle-Pivot L, Coutrot M, Chaussard M, et al. Circulating dipeptidyl peptidase-3 at admission is associated with circulatory failure, acute kidney injury and death in severely ill burn patients. *Crit Care*. 2020 Apr 22;24(1):168.
109. Deniau B, Blet A, Santos K, Vaittinada Ayar P, Genest M, Kästorf M, et al. Inhibition of circulating dipeptidyl-peptidase 3 restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: A proof of concept study. *PLoS ONE*. 2020;15(8):e0238039.
110. Evans DG, Miles AA, Niven JSF. The enhancement of bacterial infections by adrenaline. *Br J Exp Pathol*. 1948 Feb;29(1):20–39.
111. Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci*. 1992;50(3):203–12.
112. Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Mar 1;172(1):53–60.
113. Lyte M, Arulanandam BP, Frank CD. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. *J Lab Clin Med*. 1996 Oct;128(4):392–8.
114. Lyte M, Erickson AK, Arulanandam BP, Frank CD, Crawford MA, Francis DH. Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 27;232(3):682–6.
115. Coulanges V, Andre P, Vidon DJ-M. Effect of Siderophores, Catecholamines, and Catechol Compounds on *Listeria* spp. Growth in Iron-Complexed Medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998 Aug 19;249(2):526–30.
116. Burton CL, Chhabra SR, Swift S, Baldwin TJ, Withers H, Hill SJ, et al. The growth response of *Escherichia coli* to neurotransmitters and related catecholamine drugs requires a functional enterobactin biosynthesis and uptake system. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):5913–23.
117. Freestone PP, Lyte M, Neal CP, Maggs AF, Haigh RD, Williams PH. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin. *J Bacteriol*. 2000 Nov;182(21):6091–8.
118. Morgenthau A, Pogoutse A, Adamiak P, Moraes TF, Schryvers AB. Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host-microbe interactions. *Future Microbiol*. 2013 Dec;8(12):1575–85.
119. Li W, Lyte M, Freestone PP, Ajmal A, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Norepinephrine represses the expression of *toxA* and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Oct;299(1):100–9.

120. Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 5;103(27):10420–5.
121. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Feb;6(1):56–60.
122. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonasaeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):7072–7.
123. Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014 Feb;395(2):203–30.
124. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest*. 2016 Jan;126(1):23–31.
125. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):92–101.
126. Stolk RF, van der Poll T, Angus DC, van der Hoeven JG, Pickkers P, Kox M. Potentially Inadvertent Immunomodulation: Norepinephrine Use in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jul 11;194(5):550–8.
127. Liaudet L, Calderari B, Pacher P. Pathophysiological mechanisms of catecholamine and cocaine-mediated cardiotoxicity. *Heart Fail Rev*. 2014 Nov;19(6):815–24.
128. Andreis DT, Singer M. Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum. *Intensive Care Medicine*. 2016 Sep;42(9):1387–97.
129. Farmer P, Pugin J. beta-adrenergic agonists exert their ‘anti-inflammatory’ effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Oct;279(4):L675-682.
130. van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJ. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):2046–50.
131. Barnes MA, Carson MJ, Nair MG. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine*. 2015 Apr;72(2):210–9.
132. Wenisch C, Parschalk B, Weiss A, Zedwitz-Liebenstein K, Hahsler B, Wenisch H, et al. High-dose catecholamine treatment decreases polymorphonuclear leukocyte phagocytic capacity and reactive oxygen production. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996 Jul;3(4):423–8.
133. Abraham E, Kaneko DJ, Shenkar R. Effects of endogenous and exogenous catecholamines on LPS-induced neutrophil trafficking and activation. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1):L1-8.

134. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev.* 2001 Dec;53(4):487–525.
135. Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology.* 1996 May;88(1):140–6.
136. Jiang J-L, Peng Y-P, Qiu Y-H, Wang J-J. Effect of endogenous catecholamines on apoptosis of Con A-activated lymphocytes of rats. *J Neuroimmunol.* 2007 Dec;192(1–2):79–88.
137. Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O’Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):400–7.
138. Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol.* 2014 Oct;26(5):357–68.
139. Stolk RF, van der Pasch E, Naumann F, Schouwstra J, Bressers S, van Herwaarden AE, et al. Norepinephrine Dysregulates the Immune Response and Compromises Host Defense during Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020 Sep 15;202(6):830–42.
140. Levy B, Fritz C, Piona C, Duarte K, Morelli A, Guerci P, et al. Hemodynamic and anti-inflammatory effects of early esmolol use in hyperkinetic septic shock: a pilot study. *Critical Care.* 2021 Jan 7;25(1):21.
141. Schwartz JC, Malfroy B, De La Baume S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (‘enkephalinase’) as neuropeptidase. *Life Sci.* 1981 Oct 26;29(17):1715–40.
142. Ellis S, Nuenke JM. Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 1967 Oct 25;242(20):4623–9.
143. Lewis AP, Thomas PJ. A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties. *Protein Sci.* 1999 Feb;8(2):439–42.
144. Mansfeld J, Polaina J, MacCabe AP. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.* 2007;
145. Hashimoto J, Yamamoto Y, Kurosawa H, Nishimura K, Hazato T. Identification of dipeptidyl peptidase III in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jul 5;273(2):393–7.
146. Abramić M, Zubanović M, Vitale L. Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1988 Jan;369(1):29–38.
147. Vitale L, Zubanović M, Abramić M. Properties and distribution of aminopeptidase and dipeptidyl aminopeptidase III of human erythrocytes. *Acta Biol Med Ger.* 1981;40(10–11):1489–95.
148. Sato H, Kimura K, Yamamoto Y, Hazato T. [Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain]. *Masui.* 2003 Mar;52(3):257–63.

149. Swanson AA, Davis RM, McDonald JK. Dipeptidyl peptidase III of human cataractous lenses. Partial purification. *Curr Eye Res.* 1984 Feb;3(2):287–91.
150. Swanson AA, Davis RM, Albers-Jackson B, McDonald JK. Lens exopeptidases. *Exp Eye Res.* 1981 Feb;32(2):163–73.
151. Liu Y, Kern JT, Walker JR, Johnson JA, Schultz PG, Luesch H. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 20;104(12):5205–10.
152. Kar NC, Pearson CM. Dipeptidyl peptidases in human muscle disease. *Clin Chim Acta.* 1978 Jan 2;82(1–2):185–92.
153. Hopsu-Havu VK, Jansén CT. Peptidases in the skin. II. Demonstration and partial separation of several specific dipeptide naphthylamidases in the rat and human skin. *Arch Klin Exp Dermatol.* 1969;235(1):53–62.
154. Shimamori Y, Watanabe Y, Fujimoto Y. Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta. *Chem Pharm Bull.* 1986 Aug;34(8):3333–40.
155. Lee CM, Snyder SH. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J Biol Chem.* 1982 Oct 25;257(20):12043–50.
156. Ohkubo I, Li YH, Maeda T, Yamamoto Y, Yamane T, Du PG, et al. Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization. *Biol Chem.* 1999 Dec;380(12):1421–30.
157. Alba F, Arenas JC, Lopez MA. Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents. *Peptides.* 1995;16(2):325–9.
158. Lynn KR. The isolation and some properties of dipeptidyl peptidases II and III from porcine spleen. *Int J Biochem.* 1991;23(1):47–50.
159. Melloni E, Salamino F, Sparatore B, Michetti M, Morelli A, Benatti U, et al. Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Jun 11;675(1):110–6.
160. Smyth M, O’Cuinn G. Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences. *J Neurochem.* 1994 Oct;63(4):1439–45.
161. Dhanda S, Singh H, Singh J, Singh TP. Isolation, purification and characterization of a DPP-III homologue from goat brain. *Protein Expr Purif.* 2007 Apr;52(2):297–305.
162. Hazato T, Shimamura M, Ichimura A, Katayama T. Purification and characterization of two distinct dipeptidyl aminopeptidases in soluble fraction from monkey brain and their action on enkephalins. *J Biochem.* 1984 May;95(5):1265–71.
163. Casewell NR, Harrison RA, Wüster W, Wagstaff SC. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: Echis) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics.* 2009 Nov 30;10:564.

164. Mazzocco C, Fukasawa KM, Auguste P, Puirox J. Characterization of a functionally expressed dipeptidyl aminopeptidase III from *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem.* 2003 Jul;270(14):3074–82.
165. Mazzocco C, Puirox J. Purification of proctolin-binding proteins from the foregut of the insect *Blaberus craniifer*. *Eur J Biochem.* 2000 Apr;267(8):2252–9.
166. Chan SA, Toursarkissian K, Sweeney JP, Jones TH. Dipeptidyl-aminopeptidases and aminopeptidases in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Mar 29;127(3):962–8.
167. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, et al. Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* Strain W83. *J Bacteriol.* 2003 Sep 15;185(18):5591–601.
168. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis* : Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research.* 2014;2014:1–8.
169. Ryan D, Jenniches L, Reichardt S, Barquist L, Westermann AJ. A high-resolution transcriptome map identifies small RNA regulation of metabolism in the gut microbe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Nat Commun.* 2020 Jul 16;11(1):3557.
170. Xu J. A Genomic View of the Human-*Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science.* 2003 Mar 28;299(5615):2074–6.
171. Hromić-Jahjefendić A, Jajčanin Jozić N, Kazazić S, Grabar Branilović M, Karačić Z, Schrittwieser JH, et al. A novel *Porphyromonas gingivalis* enzyme: An atypical dipeptidyl peptidase III with an ARM repeat domain. Yilmaz Ö, editor. *PLoS ONE.* 2017 Nov 30;12(11):e0188915.
172. Vukelić B, Salopek-Sondi B, Špoljarić J, Sabljic I, Meštrović N, Agić D, et al. Reactive cysteine in the active-site motif of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III is a regulatory residue for enzyme activity. *Biol Chem.* 2012 Jan;393(1–2):37–46.
173. Cvitešić A, Sabljic I, Makarević J, Abramić M. Novel dipeptidyl hydroxamic acids that inhibit human and bacterial dipeptidyl peptidase III. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2016 Nov 2;31(sup2):40–5.
174. Sabljic I, Tomin M, Matovina M, Sućec I, Tomašić Paić A, Tomić A, et al. The first dipeptidyl peptidase III from a thermophile: Structural basis for thermal stability and reduced activity. Permyakov EA, editor. *PLoS ONE.* 2018 Feb 8;13(2):e0192488.
175. Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, Chernyh NA, Pimenov NV, Tourova TP, Antipov AN, et al. *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2003 Jan 1;53(1):323–9.
176. Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonović UP, Yeoh S, Yuan F, Fonović M, et al. Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol.* 2008 Mar;4(3):203–13.

177. Tanaka TQ, Deu E, Molina-Cruz A, Ashburne MJ, Ali O, Suri A, et al. Plasmodium dipeptidyl aminopeptidases as malaria transmission-blocking drug targets. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):4645–52.
178. Lehmann C, Tan MSY, de Vries LE, Russo I, Sanchez MI, Goldberg DE, et al. Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase 3 activity is important for efficient erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2018 May;14(5):e1007031.
179. Ghosh S, Chisholm SA, Dans M, Lakkavaram A, Kennedy K, Ralph SA, et al. The cysteine protease dipeptidyl aminopeptidase 3 does not contribute to egress of Plasmodium falciparum from host red blood cells. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193538.
180. Sanchez MI, de Vries LE, Lehmann C, Lee JT, Ang KK, Wilson C, et al. Identification of Plasmodium dipeptidyl aminopeptidase allosteric inhibitors by high throughput screening. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226270.
181. de Vries LE, Sanchez MI, Groborz K, Kuppens L, Poreba M, Lehmann C, et al. Characterization of P. falciparum dipeptidyl aminopeptidase 3 specificity identifies differences in amino acid preferences between peptide-based substrates and covalent inhibitors. *FEBS J*. 2019 Oct;286(20):3998–4023.
182. Diaz JR, Ramírez CA, Nocua PA, Guzman F, Requena JM, Puerta CJ. Dipeptidyl peptidase 3, a novel protease from Leishmania braziliensis. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190618.
183. Watanabe Y, Kumagai Y, Fujimoto Y. Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in Saccharomyces cerevisiae. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1990 Jan;38(1):246–8.
184. Jajčanin-Jozić N, Tomić S, Abramić M. Importance of the three basic residues in the vicinity of the zinc-binding motifs for the activity of the yeast dipeptidyl peptidase III. *J Biochem*. 2014 Jan;155(1):43–50.
185. Meliopoulos VA, Andersen LE, Brooks P, Yan X, Bakre A, Coleman JK, et al. MicroRNA regulation of human protease genes essential for influenza virus replication. *PLoS One*. 2012;7(5):e37169.
186. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 2008 Oct;89(Pt 10):2359–76.
187. HIPC-CHI Signatures Project Team, HIPC-I Consortium. Multicohort analysis reveals baseline transcriptional predictors of influenza vaccination responses. *Sci Immunol*. 2017 Aug 25;2(14):eaal4656.
188. Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Landman K, Hoek A, et al. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Apr;6(4):589–600.
189. Chadwick W, Breneman R, Martin B, Maudsley S. Complex and multidimensional lipid raft alterations in a murine model of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2010 Dec 2;2010:604792.



190. Gevaert K, Staes A, Van Damme J, De Groot S, Hugelier K, Demol H, et al. Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC. *Proteomics*. 2005 Sep;5(14):3589–99.
191. Boutin JA. Myristoylation. *Cell Signal*. 1997 Jan;9(1):15–35.
192. Zlatkine P, Mehul B, Magee AI. Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif. *J Cell Sci*. 1997 Mar;110 ( Pt 5):673–9.
193. Blenis J, Resh MD. Subcellular localization specified by protein acylation and phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Dec;5(6):984–9.
194. Vanha-Perttula T. Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties. *Clin Chim Acta*. 1988 Oct 14;177(2):179–95.
195. Wattiaux R, Wattiaux-de Coninck S, Thirion J, Gasingirwa M-C, Jadot M. Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem J*. 2007 Apr 1;403(1):89–95.
196. Baral PK, Jajčanin-Jozić N, Deller S, Macheroux P, Abramić M, Gruber K. The First Structure of Dipeptidyl-peptidase III Provides Insight into the Catalytic Mechanism and Mode of Substrate Binding\*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Aug 8;283(32):22316–24.
197. Mazzocco C, Gillibert-Duplantier J, Neaud V, Fukasawa KM, Claverol S, Bonneau M, et al. Identification and characterization of two dipeptidyl-peptidase III isoforms in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J*. 2006 Mar;273(5):1056–64.
198. Barac YD, Emrich F, Krutzwald-Josefson E, Schrepfer S, Sampaio LC, Willerson JT, et al. The ubiquitin-proteasome system: A potential therapeutic target for heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Jul;36(7):708–14.
199. York IA, Mo AXY, Lemerise K, Zeng W, Shen Y, Abraham CR, et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 2003 Mar;18(3):429–40.
200. Moore HE, Davenport EL, Smith EM, Muralikrishnan S, Dunlop AS, Walker BA, et al. Aminopeptidase inhibition as a targeted treatment strategy in myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2009 Apr;8(4):762–70.
201. Ferrando AA, Pendás AM, Llano E, Velasco G, Lidereau R, López-Otín C. Gene characterization, promoter analysis, and chromosomal localization of human bleomycin hydrolase. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):33298–304.
202. Constam DB, Tobler AR, Rensing-Ehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26931–9.
203. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1304–9.

204. Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Apr 1;244(1):37–42.
205. Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Klitzke CF, Markus RP, Ferro ES. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *J Biol Chem.* 2008 Sep 5;283(36):24448–59.
206. Wright JW, Bechtholt AJ, Chambers SL, Harding JW. Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function. *Peptides.* 1996;17(8):1365–71.
207. Moeller I, Chai SY, Smith I, Lew R, Mendelsohn FA. Haemorphin peptides may be endogenous ligands for brain angiotensin AT4 receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1998 Nov;25:S68-71.
208. Dale CS, Pagano R de L, Rioli V. Hemopressin: a novel bioactive peptide derived from the alpha1-chain of hemoglobin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:105–6.
209. Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Br J Anaesth.* 2008 Jul;101(1):40–4.
210. Mazumder S, Nath I, Dhar MM. Immunomodulation of human T cell responses with receptor selective enkephalins. *Immunol Lett.* 1993 Jan;35(1):33–8.
211. Faith RE, Liang HJ, Plotnikoff NP, Murgu AJ, Nimeh NF. Neuroimmunomodulation with enkephalins: in vitro enhancement of natural killer cell activity in peripheral blood lymphocytes from cancer patients. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1987;6(2):88–98.
212. Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Silvestroni L, Moretti C, Redi F, et al. Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;438:365–70.
213. Kew D, Muffly KE, Kilpatrick DL. Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(23):9143–7.
214. Eiden LE. The enkephalin-containing cell: strategies for polypeptide synthesis and secretion throughout the neuroendocrine system. *Cell Mol Neurobiol.* 1987 Dec;7(4):339–52.
215. Nieto MM, Guen SLE, Kieffer BL, Roques BP, Noble F. Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors. *Neuroscience.* 2005;135(2):305–13.
216. Williams CL, Jensen RA. Effects of vagotomy on Leu-enkephalin-induced changes in memory storage processes. *Physiol Behav.* 1993 Oct;54(4):659–63.
217. Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego J-C. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev.* 2007 Mar;59(1):88–123.

218. Vazeux G, Wang J, Corvol P, Llorens-Cortès C. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):9069–74.
219. Barsun M, Jajcanin N, Vukelić B, Spoljarić J, Abramić M. Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol Chem.* 2007 Mar;388(3):343–8.
220. Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun.* 1983 Feb;39(2):686–703.
221. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1753–4.
222. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):123–40.
223. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Jan;19(1):37–54.
224. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar;8(3):207–17.
225. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology (Reading).* 2003 Dec;149(Pt 12):3575–86.
226. Ducluzeau R, Raibaud P. [Microbial ecology of the digestive system]. *Agressologie.* 1985 Feb;26(2):161–3.
227. Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Krogfelt KA. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):5191–4.
228. Mitsuoka T, Hayakawa K. [The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A.* 1973 Mar;223(2):333–42.
229. Slanetz LW, Bartley CH. NUMBERS OF ENTEROCOCCI IN WATER, SEWAGE, AND FECES DETERMINED BY THE MEMBRANE FILTER TECHNIQUE WITH AN IMPROVED MEDIUM<sup>1</sup>. *J Bacteriol.* 1957 Nov;74(5):591–5.
230. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubié A-S, et al. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *Microbiologyopen.* 2015 Aug;4(4):604–15.
231. Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jul;69(7):3687–94.
232. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J.* 2011 Feb;5(2):173–83.

233. Campos CJA, Kershaw SR, Lee RJ. Environmental Influences on Faecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish. *Estuaries and Coasts*. 2013;36(4):834–53.
234. Darcan C, Ozkanca R, Idil O, Flint KP. Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Pol J Microbiol*. 2009;58(4):307–17.
235. Pommepeuy M, Butin M, Derrien A, Gourmelon M, Colwell RR, Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol*. 1996 Dec;62(12):4621–6.
236. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2014;5:258.
237. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(5):449–56.
238. Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Le Hello S, King L-A, Van Cauteren D, Lefevre S, et al. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro Surveill*. 2019 Feb 21;24(8):1800068.
239. Basmaci R, Bonacorsi S, Bidet P, Biran V, Aujard Y, Bingen E, et al. *Escherichia Coli* Meningitis Features in 325 Children From 2001 to 2013 in France. *Clin Infect Dis*. 2015 Sep 1;61(5):779–86.
240. Lefort A, Panhard X, Clermont O, Woerther P-L, Branger C, Mentré F, et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49(3):777–83.
241. Abernethy JK, Johnson AP, Guy R, Hinton N, Sheridan EA, Hope RJ. Thirty day all-cause mortality in patients with *Escherichia coli* bacteraemia in England. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015 Mar 1;21(3):251.e1-251.e8.
242. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLOS Genetics*. 2009 Jan 23;5(1):e1000344.
243. Touchon M, Perrin A, de Sousa JAM, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, et al. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. 2020 Jun;16(6):e1008866.
244. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol*. 2010 Nov;60(4):708–20.
245. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 2008 Oct;190(20):6881–93.

246. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, et al. Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res.* 2017 Jul 18;
247. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Oct;26(4):822–80.
248. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports.* 2013 Feb;5(1):58–65.
249. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4555–8.
250. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol.* 2019 Aug;21(8):3107–17.
251. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol.* 2011 Sep;13(9):2468–77.
252. Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, et al. Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. *Genome Biol Evol.* 2015 Nov 3;7(12):3170–9.
253. Lindsey RL, Garcia-Toledo L, Fasulo D, Gladney LM, Strockbine N. Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *J Microbiol Methods.* 2017 Sep;140:1–4.
254. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 2018 Jun 19;4(7):e000192.
255. Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Oct;11(10):728–36.
256. EnteroBase [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: [https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search)
257. *Escherichia coli* (Pasteur) - MLST [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: [https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst\\_mlst\\_seqdef&page=schemeInfo&scheme\\_id=5](https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=schemeInfo&scheme_id=5)
258. Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol.* 1947 Sep;57(1):71–100.
259. Brinton CC. Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature.* 1959 Mar 21;183(4664):782–6.

260. Ofek I, Doyle RJ. Bacterial Adhesion to Cells and Tissues [Internet]. Springer US; 1994 [cited 2021 Aug 3]. Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9781468464375>
261. McCormick BA, Franklin DP, Laux DC, Cohen PS. Type 1 pili are not necessary for colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by type 1-piliated *Escherichia coli* F-18 and *E. coli* K-12. *Infect Immun*. 1989 Oct;57(10):3022–9.
262. Bloch CA, Orndorff PE. Impaired colonization by and full invasiveness of *Escherichia coli* K1 bearing a site-directed mutation in the type 1 pilin gene. *Infect Immun*. 1990 Jan;58(1):275–8.
263. Bloch CA, Stocker BA, Orndorff PE. A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. *Mol Microbiol*. 1992 Mar;6(6):697–701.
264. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Mårild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9827–32.
265. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, et al. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science*. 1997 Apr 25;276(5312):607–11.
266. Klemm P, Christiansen G. Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet*. 1987 Jul;208(3):439–45.
267. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):2081–5.
268. Sokurenko EV, Courtney HS, Ohman DE, Klemm P, Hasty DL. FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J Bacteriol*. 1994 Feb;176(3):748–55.
269. Sokurenko EV, Courtney HS, Maslow J, Siitonen A, Hasty DL. Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in fimH genes. *Journal of Bacteriology*. 1995 Jul 1;177(13):3680–6.
270. Sokurenko EV, Chesnokova V, Doyle RJ, Hasty DL. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17880–6.
271. Roer L, Chesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol*. 2017 Aug;55(8):2538–43.
272. de Lastours V, Laouénan C, Royer G, Carbonnelle E, Lepeule R, Esposito-Farèse M, et al. Mortality in *Escherichia coli* bloodstream infections: antibiotic resistance still does not make it. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Aug 1;75(8):2334–43.
273. Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*. 2012 Feb;3(1):18–28.

274. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* 2013 Nov;10(11):916–32.
275. Pitout JDD, DeVinney R. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Res.* 2017 Feb 28;6:195.
276. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J Infect.* 2015 Dec;71(6):615–26.
277. Bleibtreu A, Clermont O, Darlu P, Glodt J, Branger C, Picard B, et al. The *rpoS* Gene Is Predominantly Inactivated during Laboratory Storage and Undergoes Source-Sink Evolution in *Escherichia coli* Species. *J Bacteriol.* 2014 Dec;196(24):4276–84.
278. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):26–38.
279. Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S, Bauer M, Boros M, Cavaillon J-M, et al. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Intensive Care Med Exp.* 2018 Aug 14;6(1):26.
280. Lamberg L. Researchers Urged to Tell Public How Animal Studies Benefit Human Health. *JAMA.* 1999 Aug 18;282(7):619–21.
281. Worp HB van der, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O’Collins V, et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLOS Medicine.* 2010 Mar 30;7(3):e1000245.
282. Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM, Efron PA. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR Journal.* 2017 Jul 1;58(1):90–105.
283. van der Poll T. Preclinical Sepsis Models. *Surgical Infections.* 2012 Oct 1;13(5):287–92.
284. Cohen D. Oxford TB vaccine study calls into question selective use of animal data. *BMJ.* 2018 Jan 10;360:j5845.
285. Wieschowski S, Chin WWL, Federico C, Sievers S, Kimmelman J, Strech D. Preclinical efficacy studies in investigator brochures: Do they enable risk–benefit assessment? *PLOS Biology.* 2018 Apr 5;16(4):e2004879.
286. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Critical Care Medicine.* 2017 Mar;45(3):486–552.
287. Remick DG, Ayala A, Chaudry I, Coopersmith CM, Deutschman C, Hellman J, et al. Premise for Standardized Sepsis Models. *Shock.* 2019 Jan;51(1):4–9.
288. Osuchowski MF, Thiemermann C, Remick DG. Sepsis-3 on the Block: What Does It Mean for Preclinical Sepsis Modeling? *Shock.* 2017 May;47(5):658–60.

289. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, Poll T van der. PRECLINICAL MODELS OF SHOCK AND SEPSIS: WHAT CAN THEY TELL US? *Shock*. 2005 Dec;24:1–6.
290. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31–6.
291. Montravers P, Lepape A, Dubreuil L, Gauzit R, Pean Y, Benchimol D, et al. Clinical and microbiological profiles of community-acquired and nosocomial intra-abdominal infections: results of the French prospective, observational EBIIA study. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr 1;63(4):785–94.
292. Yuan T, Wang J, Chen L, Shan J, Di L. *Lactobacillus murinus* Improved the Bioavailability of Orally Administered Glycyrrhizic Acid in Rats. *Front Microbiol*. 2020;11:597.
293. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol*. 2003 Oct;74(4):479–85.
294. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):158–75.
295. Schmittinger CA, Dünser MW, Torgersen C, Luckner G, Lorenz I, Schmid S, et al. Histologic pathologies of the myocardium in septic shock: a prospective observational study. *Shock*. 2013 Apr;39(4):329–35.
296. Lier D van, Kox M, Pickkers P. Promotion of vascular integrity in sepsis through modulation of bioactive adrenomedullin and dipeptidyl peptidase 3. *Journal of Internal Medicine*. 2021;289(6):792–806.
297. Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001 Apr;37(4):1141–6.
298. Oudart N. Le système rénine-angiotensine : données actuelles. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2005 Mar;63(2):144–53.
299. Lu S, Jin D, Wu S, Yang J, Lan R, Bai X, et al. Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai–Tibet plateau of China. *Emerg Microbes Infect*. 2016 Dec;5(12):e122.
300. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 2000 Jan;181(1):261–72.
301. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéneq C, Denamur E. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*. 2004 Jun 1;21(6):1085–94.
302. Pappenfort K, Bassler B. Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug 11;14(9):576–88.



303. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951 Sep;62(3):293–300.
304. Freestone PPE, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in Microbiology.* 2008 Feb 1;16(2):55–64.
305. Ipe DS, Ulett GC. Evaluation of the in vitro growth of urinary tract infection-causing gram-negative and gram-positive bacteria in a proposed synthetic human urine (SHU) medium. *Journal of Microbiological Methods.* 2016 Aug 1;127:164–71.
306. Abbott IJ, van Gorp E, Wijma RA, Meletiadiis J, Mouton JW, Peleg AY. Evaluation of pooled human urine and synthetic alternatives in a dynamic bladder infection in vitro model simulating oral fosfomycin therapy. *Journal of Microbiological Methods.* 2020 Apr 1;171:105861.
307. Eliot RJ, Lam R, Leake RD, Hobel CJ, Fisher DA. Plasma catecholamine concentrations in infants at birth and during the first 48 hours of life. *J Pediatr.* 1980 Feb;96(2):311–5.
308. Candito M, Albertini M, Politano S, Deville A, Mariani R, Chambon P. Plasma catecholamine levels in children. *J Chromatogr.* 1993 Aug 11;617(2):304–7.
309. Steinberg C, Notterman DA. Pharmacokinetics of Cardiovascular Drugs in Children: Inotropes and Vasopressors. *Clinical Pharmacokinetics.* 1994 Nov;27(5):345–67.
310. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jun;305(3):800–11.
311. Cowley AW, Cushman WC, Quillen EW, Skelton MM, Langford HG. Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake. *Hypertension [Internet].* 1981 May [cited 2020 Jun 3];3(3\_pt\_2). Available from: [https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.3.3\\_Pt\\_2.193](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.3.3_Pt_2.193)
312. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of Vasopressin Relevant to Management of Septic Shock. *Chest.* 2001 Sep;120(3):989–1002.
313. Baudin B. Angiotensine II. In: Elsevier. 2003. (Encyclopédie Médicobiologique).
314. Řezáčová L, Hojná S, Kopkan L, Rauchová H, Kadlecová M, Zicha J, et al. Role of angiotensin II in chronic blood pressure control of heterozygous Ren-2 transgenic rats: Peripheral vasoconstriction versus central sympathoexcitation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019 Aug;116:108996.
315. Tumlin JA, Murugan R, Deane AM, Ostermann M, Busse LW, Ham KR, et al. Outcomes in Patients with Vasodilatory Shock and Renal Replacement Therapy Treated with Intravenous Angiotensin II. *Crit Care Med.* 2018;46(6):949–57.
316. Orr HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet.* 2009 Aug;10(8):531–9.
317. Lenski RE, Travisano M. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *PNAS.* 1994 Jul 19;91(15):6808–14.

318. Jacquier H, Birgy A, Nagard HL, Mechulam Y, Schmitt E, Glodt J, et al. Capturing the mutational landscape of the beta-lactamase TEM-1. *PNAS*. 2013 Aug 6;110(32):13067–72.
319. Mira PM, Meza JC, Nandipati A, Barlow M. Adaptive Landscapes of Resistance Genes Change as Antibiotic Concentrations Change. *Molecular Biology and Evolution*. 2015 Oct 1;32(10):2707–15.
320. Perni S, Andrew PW, Shama G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology*. 2005 Dec;22(6):491–5.
321. Lyte M, Freestone PP, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, et al. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *The Lancet*. 2003 Jan;361(9352):130–5.
322. Hellman J, Bahrami S, Boros M, Chaudry IH, Fritsch G, Gozdzik W, et al. Part III: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Fluid Resuscitation and Antimicrobial Therapy Endpoints. *Shock*. 2019 Jan;51(1):33–43.
323. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001 Jul 1;48(suppl\_1):5–16.
324. Steele AM, Starr ME, Saito H. Late Therapeutic Intervention with Antibiotics and Fluid Resuscitation Allows for a Prolonged Disease Course with High Survival in a Severe Murine Model of Sepsis. *Shock*. 2017 Jun;47(6):726–34.
325. Lyte M, Bailey MT. Neuroendocrine-bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma. *J Surg Res*. 1997 Jul 1;70(2):195–201.
326. Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2006 Dec 1;72(3):384–93.

# Annexe 1 : Circulating dipeptidyl-peptidase 3 inhibition restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: a proof-of-concept study

## PLOS ONE

### RESEARCH ARTICLE

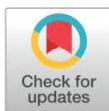
## Inhibition of circulating dipeptidyl-peptidase 3 restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: A proof of concept study

Benjamin Deniau<sup>1,2</sup>, Alice Blet<sup>1,2\*</sup>, Karine Santos<sup>3</sup>, Prabakar Vaittinada Ayar<sup>2,4,5</sup>, Magali Genest<sup>2</sup>, Mandy Kästorf<sup>3</sup>, Malha Sadoune<sup>2</sup>, Andreia de Sousa Jorge<sup>2</sup>, Jane Lise Samuel<sup>2</sup>, Nicolas Vodovar<sup>2</sup>, Andreas Bergmann<sup>3</sup>, Alexandre Mebazaa<sup>1,2,4\*</sup>, Ferial Azibani<sup>2</sup>

**1** Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis- Lariboisière, AP-HP, Paris, France, **2** UMR-S 942, INSERM, MASCOT, Paris, France, **3** 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany, **4** Université de Paris, Paris, France, **5** Emergency Department, University Hospital of Beaujon, APHP, Clichy, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* alexandre.mebazaa@aphp.fr



### OPEN ACCESS

**Citation:** Deniau B, Blet A, Santos K, Vaittinada Ayar P, Genest M, Kästorf M, et al. (2020) Inhibition of circulating dipeptidyl-peptidase 3 restores cardiac function in a sepsis-induced model in rats: A proof of concept study. PLoS ONE 15(8): e0238039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039>

**Editor:** Vincenzo Lionetti, Scuola Superiore Sant'Anna, ITALY

**Received:** April 16, 2020

**Accepted:** August 7, 2020

**Published:** August 27, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039>

**Copyright:** © 2020 Deniau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

### Abstract

Sepsis is a global economic and health burden. Dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is elevated in the plasma of septic patients. The highest levels of circulating DPP3 (cDPP3) are found in non-survivor septic shock patients. The aim of this study was to evaluate the benefits of inhibiting cDPP3 by a specific antibody, Procizumab (PCZ), on cardiac function in an experimental model of sepsis, the caecal ligation and puncture (CLP) model. Rats were monitored by invasive blood pressure and echocardiography. Results are presented as mean  $\pm$  SD, with  $p < 0.05$  considered significant. PCZ rapidly restored left ventricular shortening fraction (from  $39 \pm 4\%$  to  $51 \pm 2\%$  before and 30 min after PCZ administration ( $p = 0.004$ )). Cardiac output and stroke volume were higher in the CLP + PCZ group when compared to the CLP + PBS group ( $152 \pm 33$  mL/min vs  $97 \pm 25$  mL/min ( $p = 0.0079$ ), and  $0.5 \pm 0.1$  mL vs  $0.3 \pm 1.0$  mL ( $p = 0.009$ ), respectively) with a markedly reduced plasma DPP3 activity ( $138 \pm 70$  U/L in CLP + PCZ group versus  $735 \pm 255$  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 ( $13.3 \pm 8.2$  vs  $6.2 \pm 2.5$  UI,  $p = 0.005$ , 120 min after administration, respectively). Our study demonstrates that inhibition of cDPP3 by PCZ restored altered cardiac function during sepsis in rats.

### 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

**Funding:** The study was mainly supported by Inserm, Université of Paris and Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Paris France. 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH provided vials blinded for placebo or Procizumab, measured DPP3 activity and gave an unrestricted research grant to MASCOT research group that allowed salary support for one co-author (BD). 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH did not have a role in design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. Specific roles of the authors are described in the "authors contribution section".

**Competing interests:** AM reports personal fees from Orion, Servier, Otsuka, Philips, Sanofi, Adrenomed, Epygon and Fire 1 and grants and personal fees from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Abbott and Sphingotec. BD and AB were invited to meetings in Hennigsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. AB is CEO and shareholder at 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. KS and MK are employees of 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. Other authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research authorship and/or publication of this article. 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH holds patent rights on the DPP3 biomarker and humanized antibody Procizumab. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

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]. Exact roles of DPP3 in the heart and especially in cardiac cells are not completely understood. We recently showed that circulating DPP3 (cDPP3) was elevated in cardiogenic shock patients and that high 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 cohort of septic patients, those patients with septic shock showed higher levels of cDPP3 compared to patients with severe sepsis [8]. We hypothesised that cDPP3 could have a role 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 septic shock.

## Material and 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 rats and were approved by the research ethics committee of Paris University (protocol number S140 #9385) and complied to ARRIVE guidelines and all efforts were made to minimize suffering. Septic shock and hemodynamic monitoring were done as previously described [9,10]. All rats 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 carried out by isolating the caecum with neither ligation nor puncture (sham + PBS group). Intraperitoneal injection of 75 µg/kg of buprenorphine was used for analgesic purposes in the preoperative period. Pain was evaluated by using visual analogue scale score sheet after CLP surgery, and analgesia was adapted by using buprenorphine if needed. 16 hours later, after general anaesthesia with ketamine hydrochloride (90 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg), rats 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 cardiac dysfunction, we included only rats with a left ventricular shortening fraction (LVSF) below 45%. We plan to have 5 animals alive at the end of the 120 min hemodynamic study. To do so, we initially blinded five animals in each group (CLP + PBS and CLP + PCZ). Given the high mortality before the end of the 120-minute follow-up in the CLP + PBS group, we had to include additional animals to



achieve 5 animals surviving at 120 minutes in this 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 was 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<sup>®</sup> system and AcqKnowledge<sup>®</sup> 5.0 software (California, USA) for data acquisition, were done before randomization and every 30 minutes after the beginning of therapy (PBS or PCZ injection) during the 120 minutes of the protocol.

### Inhibition of DPP3 activity by PCZ

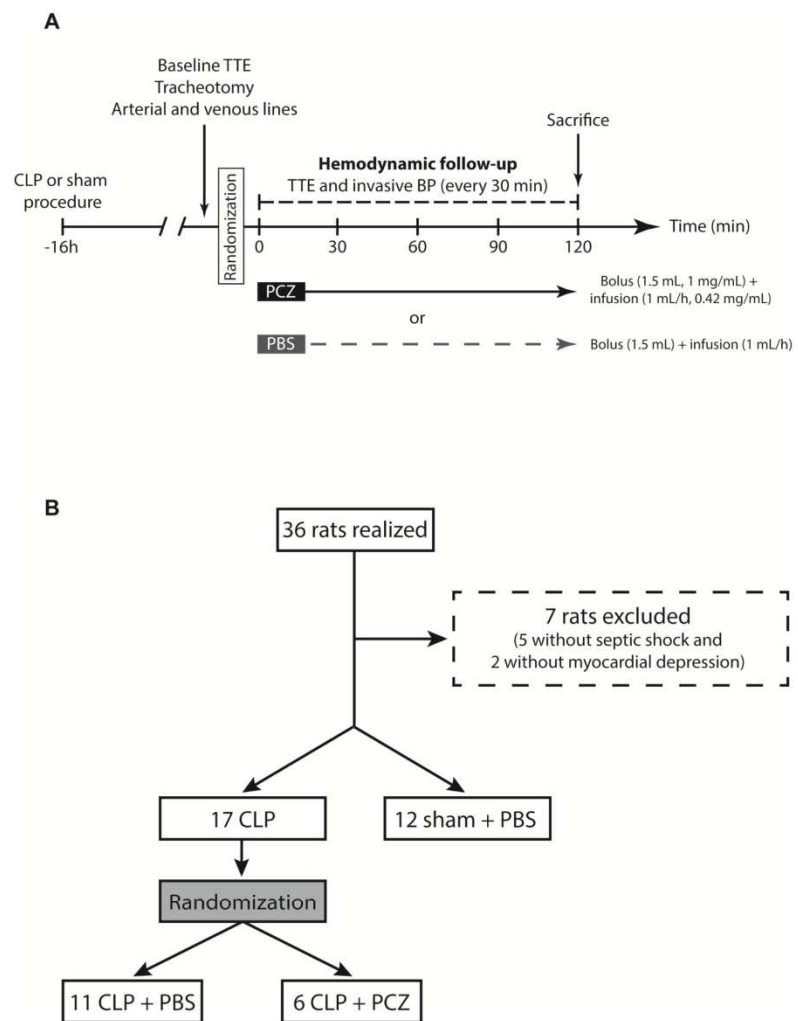
Generation, screening and development of humanized anti-DPP3 antibody PCZ was previously described [7]. In addition, the humanized DPP3-inhibiting antibody Procizumab binds to a conserved, surface exposed loop in proximity to the active site. Crystal structures of human DPP3 in apo and substrate-bound forms show that the enzyme undergoes a large conformational change between the open (apo) state and the closed (substrate-bound state). Since the epitope targeted by Procizumab remains exposed in the surface in the open and closed states, it is expected that the antibody binds the enzyme regardless of its conformation and sterically blocks the transition between DPP3 catalytic states, therefore, inhibiting enzyme activity.

### 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 pre-cooled isopentane; the apex was snap-frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$ , and plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Plasma DPP3 activity

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



**Fig 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 rat's randomization.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039.g001>

### Gene expression analyses

Total RNA were isolated from tissues using the RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed using QuantiTect<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> (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 S1 Table.

### Dihydroethidium staining

Dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich) was performed on 7  $\mu$ m myocardial cross-section as previously described [7,9].

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  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 done with a 95% confidence interval to evaluate survival. A p-value  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical analysis was realized 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 in septic rats

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 in sham + PBS 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 + PBS group, 6 in the CLP + PCZ group, and 12 in the sham + PBS group (Fig 1B). Baseline characteristics of the sham and CLP rats after randomisation are summarized in Table 1.

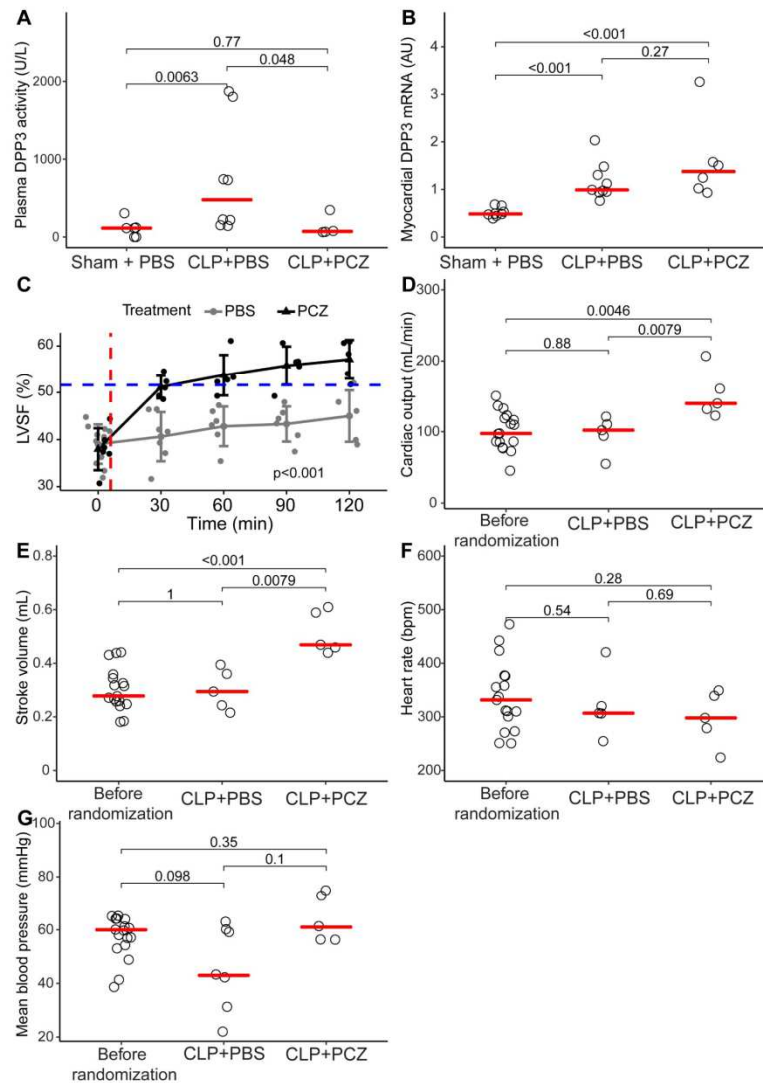
Interestingly, we found that the CLP + PBS rats had a higher cDPP3 plasma activity than the sham + PBS rats at 120 min ( $735 \pm 255$  UI/L vs  $94 \pm 41$  UI/L,  $p = 0.0063$  respectively) (Fig 2A). Similarly, DPP3 transcripts were up-regulated in the heart of the CLP + PBS rats

**Table 1. Hemodynamics and cardiac parameters in sham and CLP rats before randomisation (i.e. before PBS or PCZ injection).**

	Sham	CLP before randomization	p
	n = 12	n = 17	
LVSF (mean $\pm$ SD)	54 $\pm$ 7%	39 $\pm$ 4%	<0.001
SBP (mean $\pm$ SD)	99 $\pm$ 11 mmHg	79 $\pm$ 10 mmHg	<0.001
DBP (mean $\pm$ SD)	70 $\pm$ 12 mmHg	46 $\pm$ 10 mmHg	<0.001
MBP (mean $\pm$ SD)	79 $\pm$ 11 mmHg	57 $\pm$ 8 mmHg	<0.001
HR (mean $\pm$ SD)	321 $\pm$ 77 bpm	341 $\pm$ 62 bpm	0.428
CO (mean $\pm$ SD)	113 $\pm$ 33 mL/min	99 $\pm$ 26 mL/min	0.231
SV (mean $\pm$ SD)	0.4 $\pm$ 0.1 mL	0.3 $\pm$ 0.1 mL	0.064

Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Comparisons were done by using the 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).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039.t001>



**Fig 2. PCZ injection decreased DPP3 plasmatic activity and improved hemodynamics and cardiac function during sepsis.** (A) Plasmatic DPP3 activity in sham + PBS, CLP + PBS and CLP + PCZ groups. Comparisons were made using Wilcoxon rank-sum test. (B) Myocardial qPCR of DPP3 of sham + PBS, 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 + PBS (blue dashed line), CLP + PBS (grey line) and CLP + PCZ groups (black line) ( $p < 0.05$  using repeated measures 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 realized by using Wilcoxon rank-sum test. (bpm: beats per minutes, CLP: cecal ligation and puncture).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039.g002>



compared to the sham + PBS group ( $1.17 \pm 0.40$  AU in CLP + PBS compared to  $0.52 \pm 0.10$  in the sham + PBS group,  $p < 0.001$ ) (Fig 2B). Plasma cDPP3 activity was lower at 120 min in the PCZ group when compared to the PBS group ( $138 \pm 139$  U/L vs  $735 \pm 722$  U/L,  $p = 0.048$ ) (Fig 2A), without modifying the myocardial transcription of *DPP3* ( $1.59 \pm 0.35$  vs  $1.17 \pm 0.13$  in CLP + PBS group,  $p = 0.27$ ) (Fig 2B).

### PCZ promptly restored cardiac systolic dysfunction in septic rats

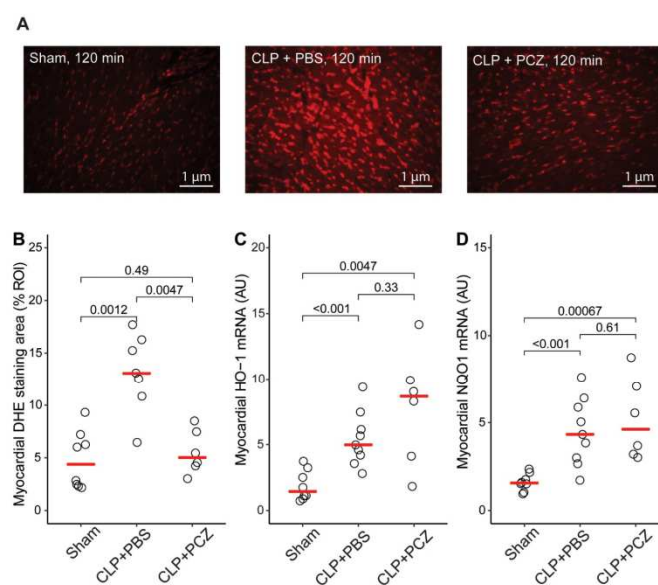
PCZ administration rapidly restored LVSF from  $39 \pm 4\%$  to  $51 \pm 2\%$  within 30 min of PCZ initiation ( $p = 0.004$ ). LVSF was higher in CLP + PCZ group when compared to CLP + PBS group ( $p < 0.001$ ) (Fig 2C). The LVSF of the PBS rats remained unchanged ( $p = 0.556$ ; Fig 2C). At the end 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 2E) compared to the rats receiving PBS. In contrast, heart rate (HR) and MBP measured at 120 minutes were similar in all CLP groups (Fig 2F and 2G). Finally, the survival rate was higher at 120 min in the PCZ group compared to the PBS group (83% versus 63%,  $p = 0.0026$ , log-rank test) (S1 Fig). Of note, LVSF and other hemodynamic parameters remained stable throughout the duration of the experiment in the sham + PBS group (S2 Fig).

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

### Discussion

Our study demonstrates that inhibition of cDPP3 by PCZ restored cardiac contractility in septic rats. These data indicate that cDPP3 plays an important part in sepsis-induced myocardial depression and suggest PCZ as a promising therapeutic option in this context. Fig 4 resumes the main findings of our work.

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 (including cytokines) were described to be associated with myocardial depression during sepsis or other acute conditions [14–19]. Other authors hypothesized that the down-regulation or uncoupling of adrenergic receptors induced by sepsis can explain the absence of response to endogenous and exogenous catecholamines, leading to septic shock [20]. Furthermore, an increased oxidative stress level may be implicated in triggering myocardial dysfunction during sepsis [21–23]. Finally, alteration of the angiotensin II pathway is another potential, but poorly studied, mechanism implicated in septic cardiomyopathy. The RAAS pathway is clearly modified during sepsis [20] with altered angiotensin II levels and reduced angiotensin II sensitivity, via the reduction or the uncoupling of angiotensin II receptors, and the consequent deterioration of its positive inotropic effects [20,24–27]. In the present study, by using a sepsis-induced model in rat, we demonstrated that blocking cDPP3 with PCZ resulted in prompt and marked cardiac contractile benefits. The present data reinforce cDPP3 as a potential myocardial depressant factor together with previous benefits of PCZ in cardiogenic shock [7]. Furthermore, the elevation of plasma cDPP3 could reduce angiotensin II levels by cleavage into angiotensin IV [6,28], as we previously observed in mouse and human plasma samples spiked with natively purified DPP3 [7]. Thus, the

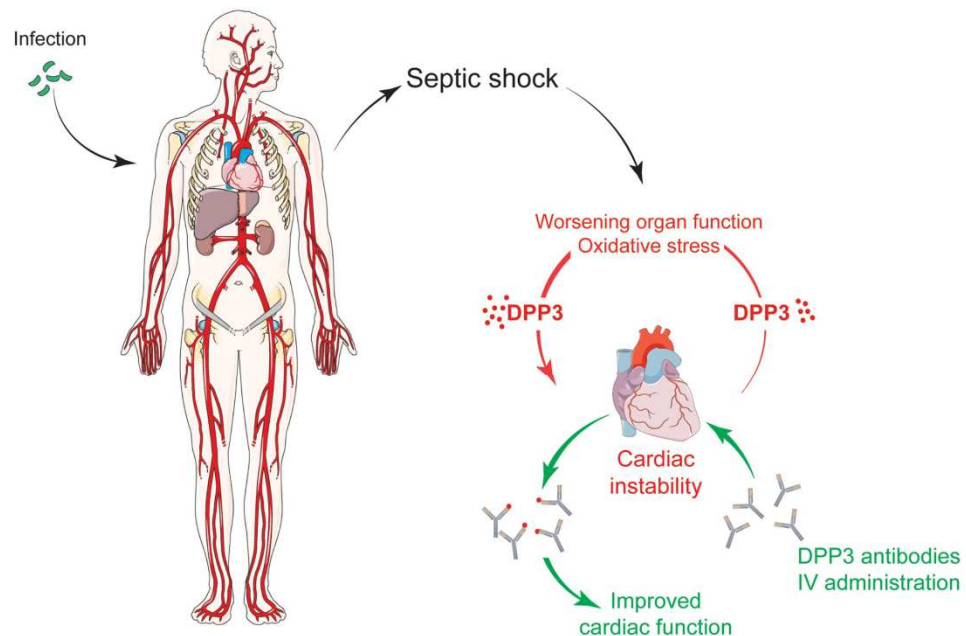


**Fig 3. PCZ injection improved myocardial oxidative stress.** Representative images (A) and quantification (B) of DHE staining from myocardial sections of sham + PBS, CLP + PBS and CLP + PCZ rat groups. Myocardial mRNA expression of *HO-1* and *NQO-1* in sham + PBS, CLP + PBS and CLP + PCZ groups. Comparisons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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039.g003>

restoration of the cardiac function in septic rats by blocking DPP3 could result from the potentiation of angiotensin II that would be normally inactivated. Altogether, these data strongly suggest that cDPP3 could be a sought-after myocardial depressing factor, which would act by decreasing the angiotensin II signalling pathway when increased in septic shock.

Our study has some limitations. First, the duration of the protocol is short as we designed this proof of principle study based on the short life span of the septic rats (18 to 20 hours post-surgery). Second, septic rats have not been fully resuscitated, particularly, we did not treat the rats with antibiotics. However, given the duration of the protocol, the administration of antibiotics is not expected to provide any improvement on the rat status. Along the same line, rats did not receive any exogenous catecholamine as the aim was to evaluate the hemodynamic benefit of cDPP3 inhibition. Nevertheless, further studies are warranted to evaluate the benefit of PCZ in fully resuscitated rats, including probabilistic antibiotherapy and catecholamine administration. Third, the mechanism of action of DPP3 and its inhibition by PCZ in septic cardiomyopathy is currently poorly understood. However, the involvement of blood pressure in the improvement of cardiac function upon PCZ treatment seems to be limited. Further studies are needed to determine PCZ's mechanism of action in heart function improvement during septic cardiomyopathy. Fourth, DPP3 activity was only measured in plasma since the antibody can only bind and inhibit DPP3 activity in plasma and not inside cells, e.g. cardiac cells. Fifth, we do not assess sex differences responses to PCZ treatment as only male mice



**Fig 4. cDPP3 is implicated in septic myocardial depression.** Its inhibition by a specific antibody, Procizumab, could be a tool to restore impaired cardiac function. Fig was built using <https://smart.servier.com>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238039.g004>

were included in this preclinical study. This is a common bias in experimental studies and more studies are needed to fill this gap.

We previously showed that cDPP3 is involved in acute heart failure in mice [7]. Our study extends the role of cDPP3 to septic cardiomyopathy. 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 in patients with septic shock, an indication where limited treatment efficacy has been observed [29]. The use of PCZ could possibly limit the use of high doses of inotropes during septic shock treatment, which has been associated with deleterious effects [30,31].

### Supporting information

**S1 Fig. 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. (TIF)

**S2 Fig. Hemodynamics and cardiac parameters remain stable in sham rats.** 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. (TIF)

**S1 Table. Primers used for qPCR.**

(DOCX)

**S1 Data.**

(XLTX)

**Author Contributions****Conceptualization:** Benjamin Deniau, Alice Blet, Karine Santos, Jane Lise Samuel, Nicolas Vodovar, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Data curation:** Benjamin Deniau.**Formal analysis:** Benjamin Deniau, Karine Santos, Jane Lise Samuel, Nicolas Vodovar, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Funding acquisition:** Karine Santos, Andreas Bergmann.**Investigation:** Benjamin Deniau, Karine Santos, Jane Lise Samuel, Ferial Azibani.**Methodology:** Benjamin Deniau, Alice Blet, Karine Santos, Prabakar Vaittinada Ayar, Magali Genest, Mandy Kästorf, Malha Sadoune, Andreia de Sousa Jorge, Jane Lise Samuel, Nicolas Vodovar, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Project administration:** Karine Santos.**Supervision:** Alice Blet, Karine Santos, Jane Lise Samuel.**Validation:** Alice Blet, Karine Santos, Jane Lise Samuel, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Visualization:** Benjamin Deniau, Alice Blet, Karine Santos, Jane Lise Samuel, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Writing – original draft:** Benjamin Deniau, Karine Santos, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**Writing – review & editing:** Benjamin Deniau, Karine Santos, Nicolas Vodovar, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani.**References**

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903336
2. Beesley SJ, Weber G, Sarge T, Nikravan S, Grissom CK, Lanspa MJ, et al. Septic Cardiomyopathy. *Crit Care Med*. 2018; 46: 625–634. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002851> PMID: 29227368
3. Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 17763–17778. <https://doi.org/10.3390/ijms160817763> PMID: 26247933
4. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016; 353: i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585> PMID: 27217054
5. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369: 2063. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1312359>
6. Prajapati SC, Singh R, Chauhan SS. Human dipeptidyl peptidase III regulates G-protein coupled receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> concentration in human embryonic kidney 293T cells. *Biol Chem*. 2016; 397: 563–569. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0117> PMID: 26887037
7. Deniau B, Rehfeld L, Santos K, Dienelt A, Azibani F, Sadoune M, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. *Eur J Heart Fail*. 2019. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1601> PMID: 31472040
8. Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergman A. Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples. *J Appl Lab Med*. 2018.



9. Blet A, Deniau B, Geven C, Sadoune M, Caillard A, Kounde P-R, et al. Adrecizumab, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats. *Intensive Care Med Exp*. 2019; 7: 25. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0255-0> PMID: 31093784
10. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009; 4: 31–36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214> PMID: 19131954
11. Bonnin P, Vilar J, Levy BI. Effect of normovolemic hematocrit changes on blood pressure and flow. *Life Sci*. 2016; 157: 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.050> PMID: 27142829
12. Milliez P, Messaoudi S, Nehme J, Rodriguez C, Samuel J-L, Delcayre C. Beneficial effects of delayed ivabradine treatment on cardiac anatomical and electrical remodeling in rat severe chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H435–441. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2008> PMID: 19074674
13. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. 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*. 1985; 76: 1539–1553. <https://doi.org/10.1172/JCI112135> PMID: 4056039
14. Pathan N, Sandiford C, Harding SE, Levin M. Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2191–2198. <https://doi.org/10.1097/00003246-200210000-00003> PMID: 12394943
15. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004; 363: 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15326-3) PMID: 14738793
16. Odeh M. Tumor necrosis factor-alpha as a myocardial depressant substance. *Int J Cardiol*. 1993; 42: 231–238. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(93\)90053-j](https://doi.org/10.1016/0167-5273(93)90053-j) PMID: 8138331
17. Meng X, Ao L, Song Y, Raeburn CD, Fullerton DA, Harken AH. 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*. 2005; 288: R600–606. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00182.2004> PMID: 15514106
18. Greene LJ, Shapanka R, Glenn TM, Lefer AM. Isolation of myocardial depressant factor from plasma of dogs in hemorrhagic shock. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 491: 275–285. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90063-0) PMID: 849462
19. Bitterman H, Stahl GL, Terashita Z, Lefer AM. Mechanisms of action of PGE1 in hemorrhagic shock in rats. *Ann Emerg Med*. 1988; 17: 457–462. [https://doi.org/10.1016/s0196-0644\(88\)80236-1](https://doi.org/10.1016/s0196-0644(88)80236-1) PMID: 3364825
20. Antonucci E, Gleeson PJ, Annoni F, Agosta S, Orlando S, Taccone FS, et al. Angiotensin II in Refractory Septic Shock. *Shock*. 2017; 47: 560–566. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000807> PMID: 27879559
21. Martin L, Horst K, Chiazza F, Oggero S, Collino M, Brandenburg K, et al. The synthetic antimicrobial peptide 19–2.5 attenuates septic cardiomyopathy and prevents down-regulation of SERCA2 in polymicrobial sepsis. *Sci Rep*. 2016; 6: 37277. <https://doi.org/10.1038/srep37277> PMID: 27853260
22. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011; 107: 57–64. <https://doi.org/10.1093/bja/aer093> PMID: 21596843
23. Joshi MS, Julian MW, Huff JE, Bauer JA, Xia Y, Crouser ED. Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 999–1007. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1507OC> PMID: 16424445
24. Feolde E, Vigne P, Frelin C. Angiotensin AT1 receptors mediate a positive inotropic effect of angiotensin II in guinea pig atria. *Eur J Pharmacol*. 1993; 245: 63–66. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(93\)90170-e](https://doi.org/10.1016/0922-4106(93)90170-e) PMID: 8477818
25. Meissner A, Min JY, Simon R. Effects of angiotensin II on inotropy and intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and hypertrophied rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30: 2507–2518. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0813> PMID: 9925385
26. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, et al. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation*. 1990; 82: 1973–1984. <https://doi.org/10.1161/01.cir.82.6.1973> PMID: 2242522
27. Petroff MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol (Lond)*. 2000; 529 Pt 1: 189–203.
28. Pang X, Shimizu A, Kurita S, Zankov DP, Takeuchi K, Yasuda-Yamahara M, et al. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. *Hypertension*. 2016; 68: 630–641. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07357> PMID: 27456521

29. Harhay MO, Casey JD, Clement M, Collins SP, Gayat É, Gong MN, et al. Contemporary strategies to improve clinical trial design for critical care research: insights from the First Critical Care Clinical Trialists Workshop. *Intensive Care Med.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05934-6> PMID: 32072303
30. Andreis DT, Singer M. Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum. *Intensive Care Med.* 2016; 42: 1387–1397. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4249-z> PMID: 26873833
31. Martin C, Medam S, Antonini F, Alingrin J, Haddam M, Hammad E, et al. NOREPINEPHRINE: NOT TOO MUCH, TOO LONG. *Shock.* 2015; 44: 305–309. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000426> PMID: 26125087

Annexe 2 : "Biological sex-related influence on long-term outcome in patients with acute dyspnea at two Lithuanian emergency departments".

Ce travail est une collaboration du laboratoire et représente un élément connexe à mes travaux de thèse. Cette étude a été réalisée sur une cohorte humaine. Bien que représentant un hiatus dans ma thèse, cela m'a permis de prendre en main et de réaliser une analyse statistique sur une base de données. Ceci a donné lieu à une publication soumise dans la revue RESPIROLOGY dont voici le manuscrit.



**Biological sex-related influence on long-term outcome in patients with acute dyspnea at two Lithuanian emergency departments**

Journal:	<i>Respirology</i>
Manuscript ID	RES-21-633
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Jun-2021
Complete List of Authors:	Vaittinada Ayar, Prabakar; Hopital Beaujon, Emergency Department, University Hospital of Beaujon, AP-HP, Clichy, France;; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine Motiejūnaitė, Justina; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine; Hôpital Bichat Claude-Bernard, Department of Clinical Physiology-Functional Explorations, University Hospital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris, France; Lithuanian University of Health Sciences Hospital Kauno klinikos, Department of Cardiology Čerlinskaitė, Kamile; Vilniaus universitetas, Clinic of Cardiac and Vascular Diseases, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine Deniau, Benjamin; Hospital Group Saint-Louis Lariboisiere and Fernand-Widal, Department of Anesthesiology and Critical Care, Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis-Lariboisière, AP-HP, Paris, France; ; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine Blet, Alice; Hospital Group Saint-Louis Lariboisiere and Fernand-Widal, Department of Anesthesiology and Critical Care, Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis-Lariboisière, AP-HP, Paris, France; ; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine Kavoliūnienė, Aušra; Lithuanian University of Health Sciences Hospital Kauno klinikos, Department of Cardiology Mebazaa, Alexandre; Hospital Group Saint-Louis Lariboisiere and Fernand-Widal, Department of Anesthesiology and Critical Care, Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis-Lariboisière, AP-HP, Paris, France; ; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine Čelutkienė, Jelena; Vilniaus universitetas, Clinic of Cardiac and Vascular Diseases, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine Azibani, Feriel; INSERM, UMR-S 942 MASCOT; Université de Paris, Ufr de Médecine
Subject Category:	Critical Care
Keywords:	Critical Care Medicine, Clinical Respiratory Medicine



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Editorial Office: [respirology@resphealth.uwa.edu.au](mailto:respirology@resphealth.uwa.edu.au); Editors-in-Chief: Philip Bardin and Paul Reynolds

1 **TITLE: Biological sex-related influence on long-term outcome in patients with acute dyspnea at two**  
2 **Lithuanian emergency departments**

3  
4 Prabakar Vaittinada Ayar, MD <sup>1,2,3\*</sup>, Justina Motiejūnaitė, MD <sup>1,3,4,5\*</sup>, Kamilė Čerlinskaitė, MD<sup>6</sup>, Benjamin  
5 Deniau, MD, PhD <sup>1,3,7</sup>, Alice Blet, MD, PhD <sup>1,3,7</sup>, Aušra Kavoliūnienė<sup>7</sup>, Alexandre Mebazaa, MD, PhD <sup>1,3,7</sup>,  
6 Jelena Čelutkienė, MD, PhD<sup>5</sup>, Feriel Azibani, PhD <sup>1,3</sup>  
7  
8  
9

10 **Affiliations:**

11  
12  
13 1 Inserm UMR-S 942 MASCOT, Lariboisière Hospital - Paris, France;

14 2 Emergency Department, University Hospital of Beaujon, AP-HP, Clichy, France;

15 3 Université de Paris, Paris, France;

16  
17 4 Department of Clinical Physiology-Functional Explorations, University Hospital Bichat-Claude Bernard,  
18 AP-HP, Paris, France;

19 5 Department of Cardiology, Hospital of Lithuanian Health Science University Kaunas Clinics;

20 6 Clinic of Cardiac and Vascular Diseases, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius  
21 University, Vilnius, Lithuania;

22 7 Department of Anesthesiology and Critical Care, Department of Anesthesia, Burn and Critical Care,  
23 University Hospitals Saint-Louis- Lariboisière, AP-HP, Paris, France;

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34 \* equally contributed

35  
36  
37  
38 **Corresponding author:**

39 Prof Alexandre Mebazaa, M.D., Ph.D.

40 alexandre.mebazaa@aphp.fr

41 Department of Anesthesia, Burn and Critical Care,

42 Lariboisière University Hospital

43 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

44 [alexandre.mebazaa@aphp.fr](mailto:alexandre.mebazaa@aphp.fr)

45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53 Abstract word count: 247

54 Text word count: 2342  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**SUMMARY AT A GLANCE:** Our large prospective cohort showed that men and women presenting to the ED with acute dyspnea differ in clinical characteristics, underlying causes, treatment and long-term outcomes. Women had better 1-year survival rates than men patients. Understanding the sex-related differences should lead towards precision medicine to promote gender equality in health.

CONFIDENTIAL for peer review only

**ABSTRACT**

1  
2  
3 Background: Acute dyspnea is the most frequent cause of emergency department (ED) admission. Whether  
4  
5 in acute settings data about the association between biological sex and acute dyspnea long-term outcomes are  
6  
7 scarce.

8  
9  
10  
11 Objectives: To assess the effect of biological sex on 1-year all-cause mortality in patients presenting with  
12  
13 acute dyspnea to the ED.

14  
15  
16 Methods: Consecutive adult patients presenting with acute dyspnea in 2 Lithuanian EDs were included.  
17  
18 Clinical characteristics, laboratory data and medication were collected. Follow-up at 1 year was performed  
19  
20 via national data registries. The primary outcome of the study was 1-year all-cause mortality. Hazard ratios  
21  
22 (HRs) for 1-year mortality according to biological sex were calculated using a Cox proportional hazards  
23  
24 regression model.  
25  
26

27  
28  
29  
30 Results: A total of 1455 patients were included. Women represented 43% of the population. Compared to  
31  
32 men, women were older [median (IQR) age 74 (65–80) vs 68 (59–77) years,  $P < 0.0001$ ]. The symptom  
33  
34 duration before admission was shorter in women [median (IQR) duration 4 (1-14) vs 7(2-14) days,  $P = 0.006$ ].  
35  
36 Unadjusted 1-year all-cause mortality was significantly lower in women (21% vs 28%,  $P = 0.001$ ). Adjusted  
37  
38 hazard ratio (HR) of 1-year all-cause mortality was lower in women (HR 0.68 [0.53-0.88],  $P = 0.0028$ ).  
39  
40 Additional sensitivity analyses confirmed the survival benefit for women in almost all subgroups.  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47  
48 Conclusion: Women have higher survival rates than men 1 year after the initial ED presentation for acute  
49  
50 dyspnea. Understanding the biological sex-related differences should lead towards precision medicine to  
51  
52 promote gender equality in health.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Key words**

Dyspnea, Emergency, Outcome, Sex

**Short title:** Acute dyspnea sex-related survival

**Abbreviation List:**

AHF: Acute heart failure

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

ED: Emergency Department

HRs: Hazard ratios

IQR: interquartile range

LVEF: left ventricular ejection fraction

peer review only

## INTRODUCTION

1  
2  
3  
4 Acute dyspnea is the most frequent complaint for patients presenting to the general emergency  
5 department (ED).<sup>1-4</sup> In the United States, dyspnea accounts for 3 to 4 million ED visits annually, representing  
6 up to 50% of admissions to tertiary care hospitals.<sup>1,5,6</sup> Bad prognosis related to this complaint should not be  
7 underestimated. Contrary to common beliefs, acute dyspnea in the ED is associated with twice the mortality  
8 risk than acute chest pain. Fast and accurate diagnosis of the underlying cause of dyspnea is critical to reduce  
9 symptoms and improve outcomes.<sup>7</sup> The most common causes of dyspnea in the ED are acute decompensated  
10 heart failure (AHF), lower respiratory tract infection, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and  
11 asthma exacerbations.<sup>8</sup> Yet differentiating between the multitude of potential causes of dyspnea poses a tough  
12 clinical challenge.

13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

What clinicians know about the diagnosis and evidence-based treatment of dyspnea originates from clinical trials mostly performed in men. Women have long been underrepresented in medical research due to the assumption that male and female cells are identical.<sup>9-12</sup> However, it has been established that women show marked differences in disease prevalence, clinical presentation, response to treatment and outcomes compared to men.<sup>10,13-16</sup> Therefore, taking into account the differences related to biological sex is essential for the success of clinical care and favorable long-term outcomes in ED patients presenting with dyspnea. The aim of the present study was to assess the effect of biological sex on 1-year all-cause mortality in patients presenting with dyspnea to the ED. Our secondary objective was to describe clinical characteristics and management of dyspneic patients according to biological sex.



## METHODS

### *Data collection*

The LEDA (Lithuanian Echocardiography Study of Dyspnea in Acute Settings, NCT03048032) cohort was part of the GREAT registry.<sup>17</sup> Consecutive adult patients presenting with acute dyspnea in 2 Lithuanian EDs were included from March 2015 to December 2017. Clinical characteristics (demographic data, clinical status, comorbidities, and chronic medication use), as well as echocardiographic and laboratory data on admission were recorded prospectively. Sex status was self-reported. For patients who survived the initial hospitalization, medication use at discharge was also recorded. Follow-up at 1 year was performed via national data registries and completed in December 2018. The primary outcome of the study was 1-year all-cause mortality.

The study was approved by The Lithuanian Bioethics Committee (Nr. L-15-01) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. As requested by the local ethics committee, patient written informed consent for data collection was obtained.

### *Diagnosis adjudication*

Team of 3 cardiologists blinded to post-discharge outcomes adjudicated the cause of acute dyspnea. All available patients' records including medical history, symptoms and signs at admission, previous or admission natriuretic peptides, routine laboratory measurements as well as echocardiography data were reviewed. Final diagnoses were classified as AHF or non-AHF; the latter included COPD/asthma exacerbation, pulmonary embolism, pulmonary/non-pulmonary infections, cancer, among others. Central adjudication of the diagnosis was previously described<sup>18</sup>.

### *Statistical analysis*

Continuous variables are expressed as median (interquartile range, IQR). Categorical variables are presented as number (percentage). All variables were tested for normality using the Shapiro–Wilk test. Group characteristics were compared with the t-test for normally distributed continuous variables or Mann–Whitney test for non-normally distributed continuous variables and chi<sup>2</sup> test for categorical variables. One-year all-cause mortality was plotted with the Kaplan–Meier curve. Hazard ratios (HRs) for 1-year mortality were calculated using a Cox proportional hazards regression model with and without adjustment for confounders (including age, systolic blood pressure, creatinine, sodium and hemoglobin). Variables that demonstrated a

6

1 significant association to the outcome in the univariate analysis were then included in multivariable adjusted  
2 analysis in order to describe how the factors jointly impact survival. The optimal model selection involved  
3  
4 finding the best compromise between the number of factors to keep and the accuracy of the Cox regression  
5  
6 analysis.  
7  
8  
9

10 Multiple imputations for missing values were performed where the data was missing at random. *P*-value for  
11  
12 the sex-by-subgroup interaction test was obtained for each of the subgroups based on the Cox's proportional  
13  
14 hazards model in which sex, subgroup, and sex-by-subgroup were included as fixed-effect factors.  
15  
16  
17

18  
19 The analyses were performed with R software (R Development Core Team, R Foundation for Statistical  
20  
21 Computing, Vienna, Austria). A two-sided *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**RESULTS***Biological sex specific clinical characteristics*

Characteristics of 1455 included patients in the study are summarized in Table 1. Forty three percent of all patients presenting to the ED with acute dyspnea were women. Compared to men, women were older [median (IQR) age 74 (65–80) vs 68 (59–77) years,  $P < 0.0001$ ], more often had a higher body mass index (31 vs 29  $\text{kg/m}^2$ ,  $P < 0.001$ ) and a higher systolic blood pressure at admission [141 (127–160) vs 138 (120–156) mmHg,  $P < 0.0001$ ]. Female patients more often had a preserved left ventricular ejection fraction (LVEF) (54% vs. 36%,  $P < 0.001$ ). Dyspnea level assessed by a heterologous visual analog scale was similar in both groups. Women presented to the ED faster than men after the initial onset of dyspnea, as the duration (days) of clinical signs before ED admission was shorter for women [median (IQR) duration 4 (1–14) vs 7(2–14),  $P = 0.006$ ]. Women also had a lower estimated glomerular filtration rate [56 (41–71) vs. 65 (48–84) mL/min/1.73m<sup>2</sup>,  $P < 0.0001$ ]. Women more often had a history of asthma (8% vs. 5%,  $P = 0.015$ ) and hypertension (81% vs 76%,  $P = 0.014$ ), whereas COPD and ischemic heart disease were more frequent among in men. ( $P < 0.0001$ ). AHF was the most frequent cause of acute dyspnea in both sexes (53% vs. 51%,  $P = 0.425$ ) and accounted for half of the study population; whereas acute arrhythmia was the second most frequent underlying disease in both sexes (15% vs. 17%,  $P = 0.210$ ). Pneumonia was more frequently associated with acute dyspnea in men (11% vs. 7%,  $P = 0.006$ ). Men were also more often diagnosed with an acute coronary syndrome (8% vs 5%,  $P = 0.037$ ) whereas in women uncontrolled hypertension was more frequently deemed to be the main cause of dyspnea (4% vs 2%,  $P = 0.012$ ).

Women presenting to the ED with dyspnea were less often admitted to hospital than men (54% vs. 66%,  $P < 0.0001$ ). Median hospital length of stay was longer for men than women [7 (0–11) vs. 5 (0–10) days, respectively,  $P < 0.001$ ]. There were no differences between sexes in terms of in-hospital mortality (respectively 6% vs. 5%,  $P = 0.373$ ) nor in 30-day mortality (respectively 9% vs. 7%,  $P = 0.208$ ). Medication at admission and discharge was often similar between sexes (Figure 1A & 1B), with an exception of beta-2-mimetics and inhaled steroids which were more frequently administered to male patients. Angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II and beta-blockers were more often prescribed to women before admission, aldosterone receptor antagonist and statins were more often prescribed to men at discharge.

8

Editorial Office: respirology@resphealth.uwa.edu.au; Editors-in-Chief: Philip Bardin and Paul Reynolds

*Long-term outcomes*

1  
2  
3 Unadjusted 1-year all-cause mortality was significantly lower in women compared to men (21% vs 28%  
4  
5 respectively,  $P = 0.003$ ) and mostly driven by cardiovascular death (10 vs. 16%,  $P = 0.003$ ). Likewise,  
6  
7 unadjusted hazard ratio (HR) of 1-year all-cause mortality was lower in women when compared to men (HR  
8  
9 0.72 [95% C.I. 0.59-0.89],  $P = 0.0027$ ) (Figure 2A). The difference persisted after adjusting for baseline  
10  
11 confounders (age, and admission systolic blood pressure, creatinine, sodium, and hemoglobin): HR 0.68 [0.53-  
12  
13 0.88],  $P = 0.0028$  (Figure 2B). Risk of death was consistently lower in women admitted for acute heart failure  
14  
15 or non-acute heart failure causes: adjusted HR 0.71 [0.51-0.99],  $P = 0.048$  for AHF subgroup (Figure. 2C) and  
16  
17 adjusted HR= 0.66 [0.46-0.92]  $P = 0.015$  for non-AHF subgroup (Figure. 2D). Additional sensitivity analyses  
18  
19 were performed and further confirmed the survival benefit for women in almost all subgroups, including age  
20  
21 greater and lower than 75 years and cause of dyspnea (cardiac or non-cardiac causes) (Figure 3). After multiple  
22  
23 imputations for missing data the survival benefit for women persisted with an HR of 0.71 [0.56-0.89],  $P =$   
24  
25 0.0026. Of note, the rate of 1-year all-cause hospital readmission was slightly lower in female patients  
26  
27 (Unadjusted HR 0.87 [0.76-1]  $P = 0.0499$ ) (Figure 4).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**DISCUSSION**

1  
2 This study describes the differences in clinical characteristics, underlying causes, treatment and outcomes of  
3  
4 acute dyspnea patients according to biological sex. More importantly, our study highlights sex-related  
5  
6 favorable long-term outcome in women compared to men.  
7  
8

9  
10 The proportion of women in our cohort (43%) was similar to previous studies that focused on dyspnea as a  
11  
12 chief complaint in ED admission<sup>3,19,20</sup>. Our results confirm that there is no gender predilection for dyspnea as  
13  
14 a symptom. The differences in clinical characteristics on admission can be explained by the fact that the most  
15  
16 common underlying disease in our cohort was acute heart failure. It is known that women develop AHF at an  
17  
18 older age, present with a higher admission blood pressure and a higher rate of preserved left ventricular  
19  
20 ejection fraction<sup>21</sup>. Our study also showed a higher LVEF in women, this result needs to be confirmed in  
21  
22 further studies  
23  
24

25  
26 Our findings confirm that acute dyspneic patients in the ED represent a diverse and complex population. The  
27  
28 most common causes of dyspnea in our cohort were acute heart failure, acute arrhythmia, pneumonia, COPD  
29  
30 exacerbation and pulmonary embolism. Dyspneic ED patients were mostly elderly (median age of 71 years)  
31  
32 and unsurprisingly presented with many comorbidities. Male patients more often presented with COPD and  
33  
34 ischemic heart disease; however, the prevalence of asthma and hypertension was more common in female  
35  
36 patients. These concomitant illnesses can make it difficult to ascertain a specific diagnosis based on clinical  
37  
38 presentation in patients with dyspnea, and patients may have multiple chronic conditions contributing to the  
39  
40 shortness of breath. Sex-related disparities in comorbidities can be explained both by pathophysiological  
41  
42 mechanisms as well as behavioral differences<sup>22</sup>. For example, the lower prevalence of ischemic heart disease  
43  
44 in female patients can be attributed to cardioprotective effects of oestrogens<sup>23,24</sup> as well as less exposure to  
45  
46 smoking.<sup>25</sup>  
47  
48  
49  
50  
51

52  
53 Our study also highlights the sex-related differences in symptom perception and health-seeking behaviors, as  
54  
55 women presented to the ED earlier after the initial onset of symptoms. Earlier studies attest that men are more  
56  
57 likely to neglect pain and disease, preventing them from receiving timely treatment and resulting in detrimental  
58  
59 outcomes<sup>26</sup>. This finding is of particular importance as we also showed a survival benefit for women 1 year  
60

10

Editorial Office: respirology@resphealth.uwa.edu.au; Editors-in-Chief: Philip Bardin and Paul Reynolds



1 after the initial ED visit. The role of gender-related behavior might therefore be an important factor in long-  
2 term mortality.  
3

4  
5 Previous studies have stressed the importance of biological sex to clinical decision making, especially  
6 concerning the referral for invasive therapeutic strategies<sup>22</sup>. In our study, female patients presenting with  
7 dyspnea to the ED were less often admitted to hospital than male patients and had a shorter hospital length of  
8 stay. However, these findings do not seem to have an impact in short-term outcomes as no differences were  
9 found in in-hospital or 30-day all-cause mortality. Disparities in treatment at discharge can mostly be  
10 explained by the differences in comorbidities and underlying causes of dyspnea.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 The present study confirms that dyspnea is a high-risk condition for death in the year following the initial ED  
21 presentation. Our findings demonstrate that 1-year all-cause mortality was in favor of women compared to  
22 men. This result was consistent among subgroups, irrespective of age, comorbidities or underlying disease.  
23  
24 Earlier studies have shown a long-term mortality benefit for women in AHF<sup>20</sup> as well as COPD<sup>15</sup>. To our  
25 knowledge, our study is the first to report long-term outcomes of dyspnea according to biological sex in a  
26 large and heterogeneous ED patient population. A variety of pathophysiological and societal factors might  
27 account for differences observed between women and men. More research is warranted to explain the sex-  
28 related disparities in long-term mortality. Interestingly, our data from a large ED population of acute dyspnea  
29 also confirms that mortality benefit is not always associated with lower readmission rate, as recently  
30 demonstrated in AHF.<sup>27</sup>  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

44 Our study has an important clinical impact for emergency care. It emphasizes the importance of sex-related  
45 differences in the acute presentation of dyspneic patients and the need for sex-specific treatment guidelines.  
46  
47 It also highlights the necessity for an appropriate discharge analysis in order to address the differences between  
48 women and men and reduce long-term mortality. Accordingly, understanding the sex-related differences in  
49 patients presenting to the ED could facilitate acute management and improve long-term prognosis of acute  
50 dyspnea. Significant differences in patient outcomes according to biological sex warrant further investigation.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

to the analysis of study results. Including a gender dimension in clinical studies and practice should contribute to the understanding of different clinical manifestations and outcomes of diseases in women and men.

CONFIDENTIAL for peer review only

**Limitations**

1  
2  
3 Our study has several limitations. Firstly, this is a two-center study from one European country, which might  
4  
5 carry some biases in inclusion of dyspnea patients. However, the proportion of women included and the  
6  
7 baseline characteristics of the study population were comparable to what has previously been described<sup>28,29</sup>.  
8  
9  
10 In addition, the study sample is large and presents all comers suggesting generalization of findings. Secondly,  
11  
12 our analysis is limited due to incomplete and missing data, even though it was accounted for by multiple  
13  
14 imputations. In addition, the registry did not include certain important confounding factors, such as the  
15  
16 information on inpatient medication strategies or post-baseline factors including clinical worsening in the days  
17  
18 following the index ED visit. Even though we adjusted for a number of covariates, there is still the possibility  
19  
20 that unmeasured confounders remain unaccounted for in our analysis. Finally, rather than genetic sex, we  
21  
22 stratified our results by self-reported sex status. How this may impact long-term outcomes remains unclear.  
23  
24  
25

**Conclusion**

26  
27  
28 In summary, our study showed that men and women presenting to the ED with acute dyspnea differ in clinical  
29  
30 characteristics, underlying causes, treatment and long-term outcomes. Women have better 1-year survival  
31  
32 rates than men patients after the initial ED presentation for acute dyspnea. Understanding the sex-related  
33  
34 differences should lead towards precision medicine, and improve clinical decision making to promote gender  
35  
36 equality in health.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**CONFLICT OF INTEREST STATEMENTS:**

AM reports personal fees from Novartis, Orion, Roche, Sanofi and grants and personal fees from Adrenomed and from Abbott, grants from 4TEEN4, outside the submitted work J.Č. has received speaker and investigator fees from Servier, Novartis, Grindex, Berlin-Chemie Menarini, Roche Diagnostics. P.V.A., J.M., K.Č., B.D., A.B., A.K., F.A. report no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

**Funding:**

The work was supported by the Research Council of Lithuania (Lietuvos mokslo taryba), grant Nr. MIP-049/2015 and approved by Lithuanian Bioethics Committee, Nr. L-15-01.

## REFERENCES

1. Kelly AM, Keijzers G, Klim S, Graham CA, Craig S, Kuan WS, Jones P, Holdgate A, Lawoko C, Laribi S, AANZDEM Study Group. An Observational Study of Dyspnea in Emergency Departments: The Asia, Australia, and New Zealand Dyspnea in Emergency Departments Study (AANZDEM). *Acad Emerg Med*. 2017 Mar;24(3):328–36.
2. Langlo NMF, Orvik AB, Dale J, Uleberg O, Bjornsen LP. The acute sick and injured patients: an overview of the emergency department patient population at a Norwegian University Hospital Emergency Department. *Eur J Emerg Med*. 2014 Jun;21(3):175–80.
3. Ashman JJ, Cairns C, DeFrances CJ, Schwartzman A. Respiratory Illness Emergency Department Visits in the National Hospital Care Survey and the National Hospital Ambulatory Medical Care Survey. *Natl Health Stat Report*. 2021 Jan;(151):1–18.
4. Fedullo AJ, Swinburne AJ, McGuire-Dunn C. Complaints of breathlessness in the emergency department. The experience at a community hospital. *N Y State J Med*. 1986 Jan;86(1):4–6.
5. Hutchinson A, Pickering A, Williams P, Bland JM, Johnson MJ. Breathlessness and presentation to the emergency department: a survey and clinical record review. *BMC Pulm Med*. 2017 Mar 20;17(1):53.
6. Niska R, Bhuiya F, Xu J. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2007 emergency department summary. *Natl Health Stat Report*. 2010 Aug 6;(26):1–31.
7. Mueller C. Acute dyspnoea in the emergency department [Internet]. Vol. 1. Oxford University Press; 2017 [cited 2021 Feb 19]. Available from: <http://www.oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199687039.001.0001/med-9780199687039-chapter-9>
8. Gondos T, Szabó V, Sárkány Á, Sárkány A, Halász G. Estimation of the severity of breathlessness in the emergency department: a dyspnea score. *BMC Emerg Med*. 2017 Apr 26;17(1):13.



- 1 9. Johnson P, Fitzgerald T, Salganicoff A, Wood SF, Goldstein JM. Sex-specific medical research: why  
2 women's health can't wait. A report of the Mary Horrigan Connors Center for Women's Health &  
3 Gender Biology at Brigham and Women's Hospital Brigham and Women's Hospital. 2014;  
4  
5  
6  
7
- 8 10. Parissis JT, Mantziari L, Kaldoglou N, Ikonomidis I, Nikolaou M, Mebazaa A, Altenberger J, Delgado  
9 J, Vilas-Boas F, Paraskevaidis I, Anastasiou-Nana M, Follath F. Gender-related differences in patients  
10 with acute heart failure: management and predictors of in-hospital mortality. *Int J Cardiol*. 2013 Sep  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18
- 19 11. Labots G, Jones A, de Visser SJ, Rissmann R, Burggraaf J. Gender differences in clinical registration  
20 trials: is there a real problem? *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Apr;84(4):700–7.  
21  
22  
23
- 24 12. Pahus L, Suehs CM, Halimi L, Bourdin A, Chanez P, Jaffuel D, Marciano J, Gamez A-S, Vachier I,  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32
- 33 13. Pribish AM, Beyer SE, Krawisz AK, Weinberg I, Carroll BJ, Secemsky EA. Sex differences in  
34 presentation, management, and outcomes among patients hospitalized with acute pulmonary embolism.  
35  
36  
37  
38  
39
- 40 14. Groeneveld JM, Ballering AV, van Boven K, Akkermans RP, Olde Hartman TC, Uijen AA. Sex  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47
- 48 15. Perez TA, Castillo EG, Ancochea J, Pastor Sanz MT, Almagro P, Martínez-Camblor P, Miravittles M,  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 R, Sin DD, Puhan MA, Soriano JB. Sex differences between women and men with COPD: A new  
2 analysis of the 3CIA study. *Respir Med.* 2020 Sep;171:106105.  
3  
4  
5  
6 16. Nieminen MS, Harjola V-P, Hochadel M, Drexler H, Komajda M, Brutsaert D, Dickstein K,  
7 Ponikowski P, Tavazzi L, Follath F, Lopez-Sendon JL. Gender related differences in patients  
8 presenting with acute heart failure. Results from EuroHeart Failure Survey II. *Eur J Heart Fail.* 2008  
9 Feb;10(2):140–8.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16 17. Mebazaa A, Gayat E, Lassus J, Meas T, Mueller C, Maggioni A, Peacock F, Spinar J, Harjola V-P, van  
17 Kimmenade R, Pathak A, Mueller T, Tavazzi L, Disomma S, Metra M, Pascual-Figureal D, Laribi S,  
18 Logeart D, Nouria S, Sato N, Parenica J, Deye N, Boukef R, Collet C, Van den Berghe G, Cohen-Solal  
19 A, Januzzi JL, GREAT Network. Association between elevated blood glucose and outcome in acute  
20 heart failure: results from an international observational cohort. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Feb  
21 26;61(8):820–9.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31 18. Breidthardt T, Sabti Z, Ziller R, Rassouli F, Twerenbold R, Kozhuharov N, Gayat E, Shrestha S, Barata  
32 S, Badertscher P, Boeddinghaus J, Nestelberger T, Mueller C. Diagnostic and prognostic value of  
33 cystatin C in acute heart failure. *Clin Biochem.* 2017 Dec;50(18):1007–13.  
34  
35  
36  
37  
38  
39 19. Cydulka RK, Rowe BH, Clark S, Emerman CL, Rimm AR, Camargo CA. Gender differences in  
40 emergency department patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Acad Emerg*  
41 *Med.* 2005 Dec;12(12):1173–9.  
42  
43  
44  
45  
46  
47 20. Motiejūnaitė J, Akiyama E, Cohen-Solal A, Maggioni AP, Mueller C, Choi D-J, Kavoliūnienė A,  
48 Čelutkienė J, Parenica J, Lassus J, Kajimoto K, Sato N, Miró Ò, Peacock WF, Matsue Y, Voors AA,  
49 Lam CSP, Ezekowitz JA, Ahmed A, Fonarow GC, Gayat E, Regitz-Zagrosek V, Mebazaa A. The  
50 association of long-term outcome and biological sex in patients with acute heart failure from different  
51 geographic regions. *European Heart Journal.* 2020 Apr 1;41(13):1357–64.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 21. Kajimoto K, Minami Y, Sato N, Otsubo S, Kasanuki H, Acute Decompensated Heart Failure  
2 Syndromes (ATTEND) registry. Gender Differences in Left Ventricular Ejection Fraction and  
3  
4 Outcomes Among Patients Hospitalized for Acute Decompensated Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2017  
5  
6 May 15;119(10):1623–30.  
7  
8  
9
- 10 22. Mauvais-Jarvis F, Bairey Merz N, Barnes PJ, Brinton RD, Carrero J-J, DeMeo DL, De Vries GJ,  
11  
12 Epperson CN, Govindan R, Klein SL, Lonardo A, Maki PM, McCullough LD, Regitz-Zagrosek V,  
13  
14 Regensteiner JG, Rubin JB, Sandberg K, Suzuki A. Sex and gender: modifiers of health, disease, and  
15  
16 medicine. *Lancet*. 2020;396(10250):565–82.  
17  
18  
19
- 20 23. Mehta LS, Beckie TM, DeVon HA, Grines CL, Krumholz HM, Johnson MN, Lindley KJ, Vaccarino  
21  
22 V, Wang TY, Watson KE, Wenger NK, American Heart Association Cardiovascular Disease in  
23  
24 Women and Special Populations Committee of the Council on Clinical Cardiology, Council on  
25  
26 Epidemiology and Prevention, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, and Council on Quality  
27  
28 of Care and Outcomes Research. Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement From  
29  
30 the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Mar 1;133(9):916–47.  
31  
32  
33
- 34 24. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease.  
35  
36 *Physiol Rev*. 2017 Jan;97(1):1–37.  
37  
38  
39
- 40 25. Millett ERC, Peters SAE, Woodward M. Sex differences in risk factors for myocardial infarction:  
41  
42 cohort study of UK Biobank participants. *BMJ*. 2018 Nov 7;363:k4247.  
43  
44  
45
- 46 26. White A. The state of men's health in Europe. European Commission; 2011.  
47  
48  
49
- 50 27. Kimmoun A, Takagi K, Gall E, Ishihara S, Hammoum P, El Bèze N, Bourgeois A, Chassard G,  
51  
52 Pegorer-Sfes H, Gayat E, Solal AC, Hollinger A, Merklung T, Mebazaa A, METAHF team. Temporal  
53  
54 trends in mortality and readmission after acute heart failure: A systematic review and meta-regression  
55  
56 in the past four decades. *Eur J Heart Fail*. 2021 Jan 14;  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
28. Laribi S, Keijzers G, van Meer O, Klim S, Motiejunaite J, Kuan WS, Body R, Jones P, Karamercan M, Craig S, Harjola V-P, Holdgate A, Golea A, Graham C, Verschuren F, Capsec J, Christ M, Grammatico-Guillon L, Barletta C, Garcia-Castrillo L, Kelly A-M, AANZDEM and EURODEM study groups. Epidemiology of patients presenting with dyspnea to emergency departments in Europe and the Asia-Pacific region. *Eur J Emerg Med.* 2019 Oct;26(5):345–9.
29. Maisel A, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Landsberg JW, Ponikowski P, Mockel M, Hogan C, Wu AHB, Richards M, Clopton P, Filippatos GS, Di Somma S, Anand I, Ng L, Daniels LB, Neath S-X, Christenson R, Potocki M, McCord J, Terracciano G, Kremastinos D, Hartmann O, von Haehling S, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-region pro-hormone markers for diagnosis and prognosis in acute dyspnea: results from the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2010 May 11;55(19):2062–76.



**Table 1** Comparison of baseline characteristics and outcomes in acute dyspnea patients according to biological sex (N=1455)

	Available data (N (%))	Overall	Men	Women	<i>P</i> value
<b>Gender</b>	1455 (100)	1455	824 (57)	631 (43)	-
<b>Age (years)</b>	1455 (100)	71 [62-79]	68 [59-77]	74 [65-80]	<0.0001
<b>Clinical parameters on admission</b>					
Systolic blood pressure (mmHg)	1425 (98)	140 [123-160]	138 [120-156]	141 [127-160]	0.0001
Heart rate (b.p.m.)	1425 (98)	88 [73-104]	88 [74-105]	86 [72-103]	0.203
Visual analog scale of dyspnea	1201 (83)	7 [5-8]	7 [5-8]	7 [5-8]	0.055
Duration of dyspnea before admission (days)	1151 (79)	5 [1-14]	7 [2-14]	4 [1-14]	0.006
LVEF on admission (%) <sup>§</sup>	415 (92)	45 [30-55]	36 [25-53]	54 [40-55]	< 0.001
Oxygen Saturation (%)	1069 (73)	94 [89-96]	93 [89-96]	94 [90-96]	0.053
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	805 (55)	29 [25-34]	29 [25-34]	31 [26-36]	0.001
Respiratory rate (b.p.m)	723 (50)	20 [16-22]	20 [17-22]	20 [16-22]	0.551
<b>Laboratory tests on admission</b>					
Haemoglobin (g/dL)	1370 (94)	13 [12-14]	14 [12-15]	13 [11-14]	<0.0001
Creatinine (µmol/L)	1346 (93)	94 [76-123]	100 [81-131]	85 [71-113]	<0.0001
Estimated GFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	1346 (93)	61 [44-78]	65 [48-84]	56 [41-71]	<0.0001
Sodium (mmol/L)	1237 (85)	139 [136-141]	139 [136-141]	139 [136-142]	0.0004
CRP (mg/L)	1204 (83)	10 [4-34]	13 [4-42]	8 [3-26]	<0.0001
NT-proBNP (ng/L)	1405 (97)	1828 [453-	2038 [541-	1540 [384-	0.042

		5305]	5508]	4932]		
1						
2						
3	Hs-TnT (ng/L)	1405 (97)	27 [13-48]	30 [20-50]	20 [10-40]	<0.0001
4						
5	<b>Medical History</b>					
6						
7	Hypertension	1429 (98)	1120 (78)	618 (76)	502 (81)	0.02
8						
9	Previous history of heart failure	1429 (98)	877 (61)	511 (63)	366 (59)	0.182
10						
11	Atrial fibrillation/atrial flutter	1429 (98)	618 (43)	349 (43)	269 (44)	0.858
12						
13	Coronary artery disease	1429 (98)	495 (35)	305 (38)	190 (31)	0.009
14						
15	Diabetes mellitus	1429 (98)	324 (23)	174 (21)	150 (24)	0.221
16						
17	Myocardial infarction	1429 (98)	290 (20)	194 (24)	96 (16)	0.0001
18						
19	COPD	1429 (98)	190 (13)	151 (19)	39 (6)	<0.0001
20						
21	Smoking habits	1429 (98)	149 (10)	133 (16)	16 (3)	<0.0001
22						
23	Asthma	1429 (98)	85 (6)	38 (5)	47 (8)	0.027
24						
25	Last known LVEF (%)	1132 (78)	50 [35-55]	45 [30-55]	55 [45-55]	<0.0001
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32	<b>Medication at admission</b>					
33						
34	Beta-blockers	1428 (98)	713 (50)	372 (46)	341 (55)	0.001
35						
36	Diuretics	1428 (98)	615 (43)	350 (43)	265 (43)	0.981
37						
38	ACEIs or ARBs	1428 (98)	650 (46)	341 (42)	309 (50)	0.003
39						
40	Aldosterone receptor antagonists	1428 (98)	243 (17)	146 (18)	97 (16)	0.287
41						
42	Vitamin K antagonists	1428 (98)	390 (27)	212 (26)	178 (29)	0.281
43						
44	Antiplatelets	1428 (98)	335 (23)	201 (25)	134 (22)	0.197
45						
46	Statins	1428 (98)	184 (13)	113 (14)	71 (12)	0.202
47						
48	Calcium antagonists	1428 (98)	212 (15)	109 (13)	103 (17)	0.102
49						
50	Oral antidiabetics	1428 (98)	180 (13)	94 (12)	86 (14)	0.214
51						
52	Beta2mimetics	1428 (98)	115 (8)	81 (10)	34 (6)	0.003
53						
54	Inhaled steroids	1428 (98)	80 (6)	59 (7)	21 (3)	0.002
55						
56						
57						
58						
59						
60						

<b>Causes of acute dyspnea</b>						
1						
2						
3	Acute heart failure	1455 (100)	761 (52)	439 (53)	322 (51)	0.425
4						
5	Atrial fibrillation/flutter	1455 (100)	228 (16)	120 (15)	108 (17)	0.210
6						
7	Pneumonia	1455 (100)	134 (9)	91 (11)	43 (7)	0.008
8						
9						
10	Pulmonary embolism	1455 (100)	117 (8)	62 (8)	55 (9)	0.465
11						
12	Acute coronary syndrome	1455 (100)	99 (7)	66 (8)	33 (5)	0.048
13						
14						
15	COPD	1455 (100)	82 (6)	62 (8)	20 (3)	0.001
16						
17	Cancer	1455 (100)	60 (4)	39 (5)	21 (3)	0.229
18						
19						
20	Uncontrolled Hypertension	1455 (100)	36 (2)	13 (2)	23 (4)	0.019
21						
22						
23	Asthma	1455 (100)	32 (2)	7 (1)	25 (4)	0.0001
24						
25	<b>Hospital length of stay (days)</b>	1455 (100)	6 (0-11)	7 (0-11)	5 (0-10)	<0.0001
26						
27	<b>Medication at discharge*</b>					
28						
29	Beta-blockers	1369 (99.9)	813 (59)	451 (58)	362 (61)	0.366
30						
31						
32	Diuretics	1369 (99.9)	780 (57)	453 (59)	327 (55)	0.205
33						
34	ACEIs or ARBs	1369 (99.9)	732 (53)	410 (53)	322 (54)	0.714
35						
36						
37	Aldosterone receptor antagonists	1369 (99.9)	369 (27)	235 (30)	134 (23)	0.002
38						
39	Vitamin K antagonists	1369 (99.9)	517 (38)	298 (39)	219 (37)	0.559
40						
41						
42	Antiplatelets	1369 (99.9)	409 (30)	246 (32)	163 (27)	0.089
43						
44	Statins	1369 (99.9)	272 (20)	170 (22)	102 (17)	0.032
45						
46	Calcium antagonists	1369 (99.9)	195 (14)	99 (13)	96 (16)	0.094
47						
48						
49	Oral antidiabetics	1369 (99.9)	204 (15)	112 (14)	92 (15)	0.664
50						
51	Beta2mimetics	1369 (99.9)	129 (9)	88 (11)	41 (7)	0.007
52						
53						
54	Inhaled steroids	1369 (99.9)	94 (7)	66 (9)	28 (5)	0.008
55						
56	<b>Outcomes</b>					
57						
58	Admission	1455 (100)	886 (61)	543 (66)	343 (54)	<0.0001
59						
60						

1	Hospital length of stay (days) <sup>†</sup>	886 (100)	9 [6-13]	9 [6-14]	8 [6-12]	0.061
2						
3	In-hospital mortality	1455 (100)	84 (6)	52 (6)	32 (5)	0.373
4						
5	30-day mortality	1455 (100)	120 (8)	75 (9)	45 (7)	0.208
6						
7	1-year mortality	1455 (100)	364 (25)	231 (28)	133 (21)	0.003
8						
9	1-year cardiovascular death	1455 (100)	193 (13)	129 (16)	64 (10)	0.003
10						
11	1-year non-cardiovascular death	1455 (100)	171 (12)	102 (12)	69 (11)	0.444
12						
13	1-year readmission*	1371 (100)	853 (62)	498 (65)	355 (59)	0.054
14						
15						
16						

17 Data are presented as median (interquartile range) for continuous data and as percentage (n=) for categorical data. The P-value to  
 18 the right represent the test for trend determined by either Wilcoxon rank-sum (continuous data) or chi-square [categorical data].

19 Abbreviations: ACEI. angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB. angiotensin II receptor blocker; BMI. body mass index; b.p.m.  
 20 beats or breaths per minute; COPD. chronic obstructive pulmonary disease; GFR. glomerular filtration rate; LVEF. left ventricular  
 21 ejection fraction; NT-proBNP. N-terminal-proB-type natriuretic peptide; Hs-TnT. High sensitive-Troponin T.

22 <sup>§</sup> - cardiac ultrasound during the first 48 hours after admission performed in 452 patients; \*- in patients, who survived initial  
 23 admission; † - in hospitalized patients  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60



**FIGURE LEGEND**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 1**

(A) Medication at admission according to biological sex. N=1455

(B) Medication at discharge according to biological sex. N = 1371 hospital survivors

**Figure 2**

(A) Graphical display of hazard ratio for long-term mortality according to biological sex of acute dyspnea patients. Unadjusted hazard ratios and 95% confidence intervals for the association between gender and long-term all-cause mortality. N=1455

(B) Graphical display of adjusted hazard ratio for long-term mortality according to biological sex of acute dyspnea patients and age, systolic blood pressure, hemoglobin, sodium, creatinine. Adjusted hazard ratios and 95% confidence intervals for the association between gender and long-term all-cause mortality. N=1170

(C) Graphical display of adjusted hazard ratio for long-term mortality according to biological sex of acute dyspnea in AHF patients and age, systolic blood pressure, hemoglobin, MDRD glomerular filtration rate. Adjusted hazard ratios and 95% confidence intervals for the association between gender and long-term all-cause mortality. N=705

(D) Graphical display of hazard ratio for long-term mortality according to biological sex of acute dyspnea in non-AHF patient and age, systolic blood pressure, hemoglobin, sodium. Adjusted hazard ratios and 95% confidence intervals for the association between gender and long-term all-cause mortality. N=542

**Figure 3** Hazard ratio for long-term mortality according to biological sex of acute dyspnea after sensitivity and interaction analysis.

Notes: BNP and NT-proBNP median value level as threshold

Abbreviations: BMI, body mass index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GFR, glomerular filtration rate; NT-proBNP, N-terminal-proB-type natriuretic peptide; BNP; Brain Natriuretic Peptide

**Figure 4** Graphical display of hazard ratio for re-admission according to biological sex of acute dyspnea patients. Unadjusted hazard ratios and 95% confidence intervals for the association between gender and rehospitalization during 1 year. N = 1371 (\* in patients who survived initial admission)

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

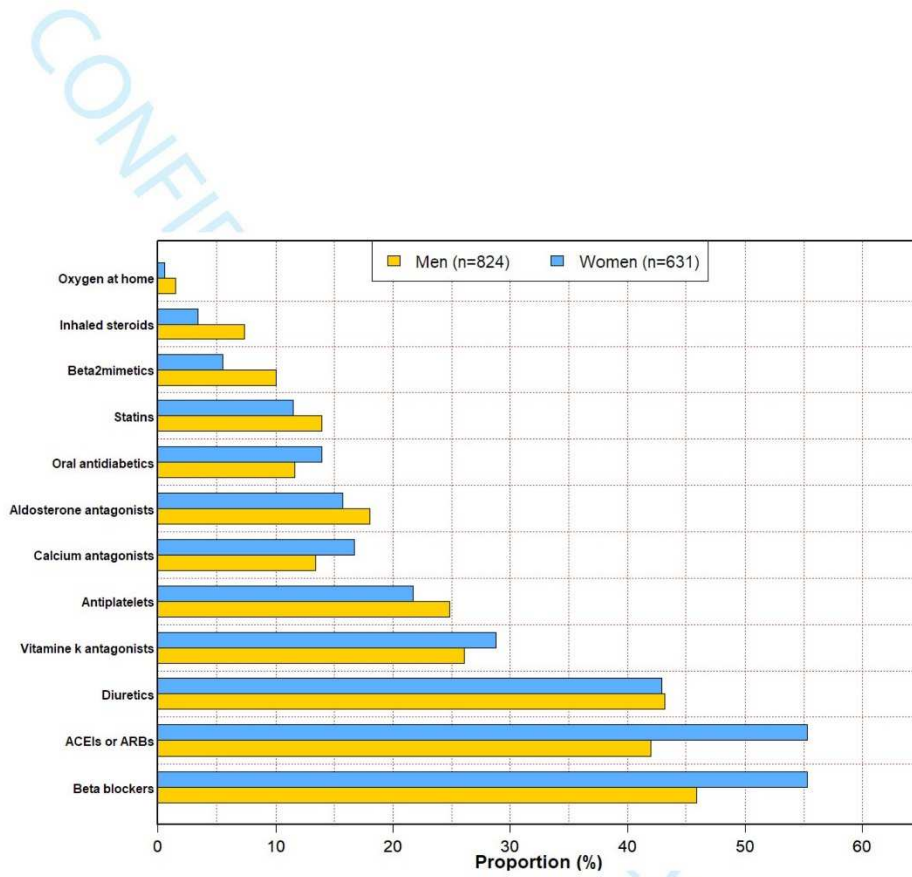


Figure 1A

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

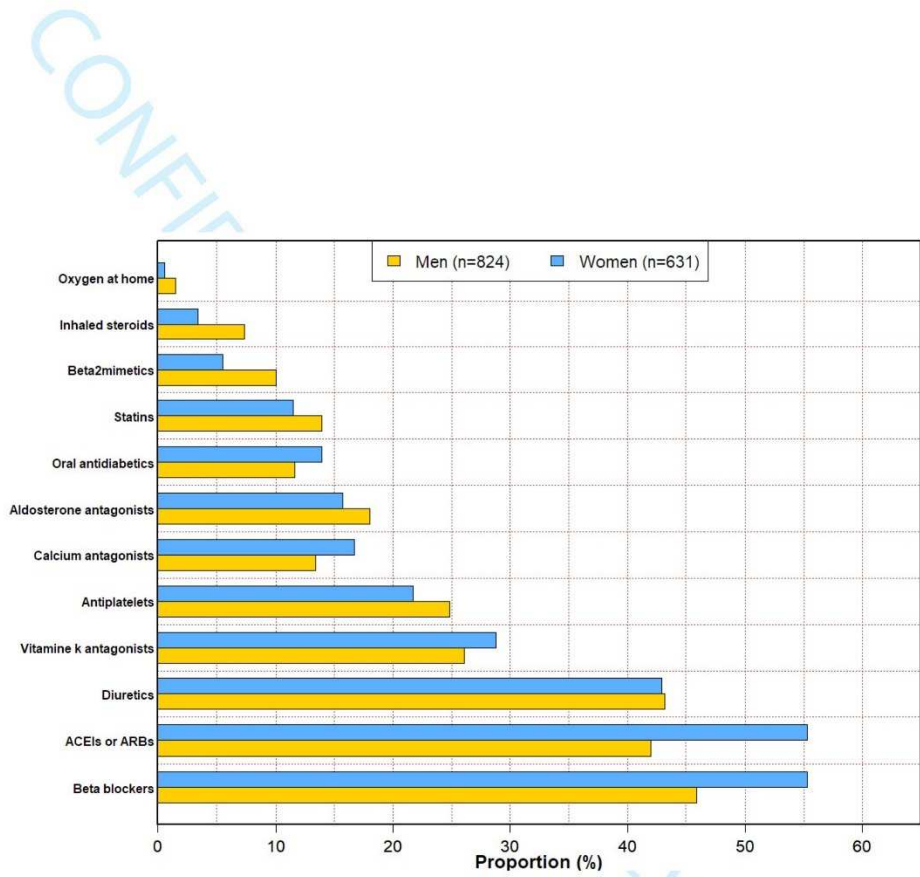


Figure 1B

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

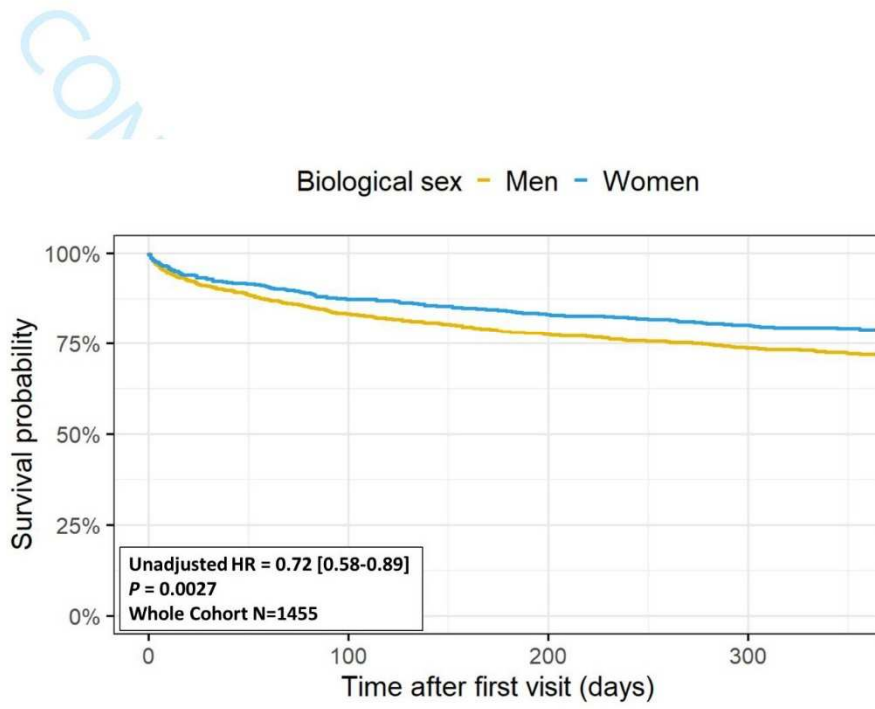


Figure 2A

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

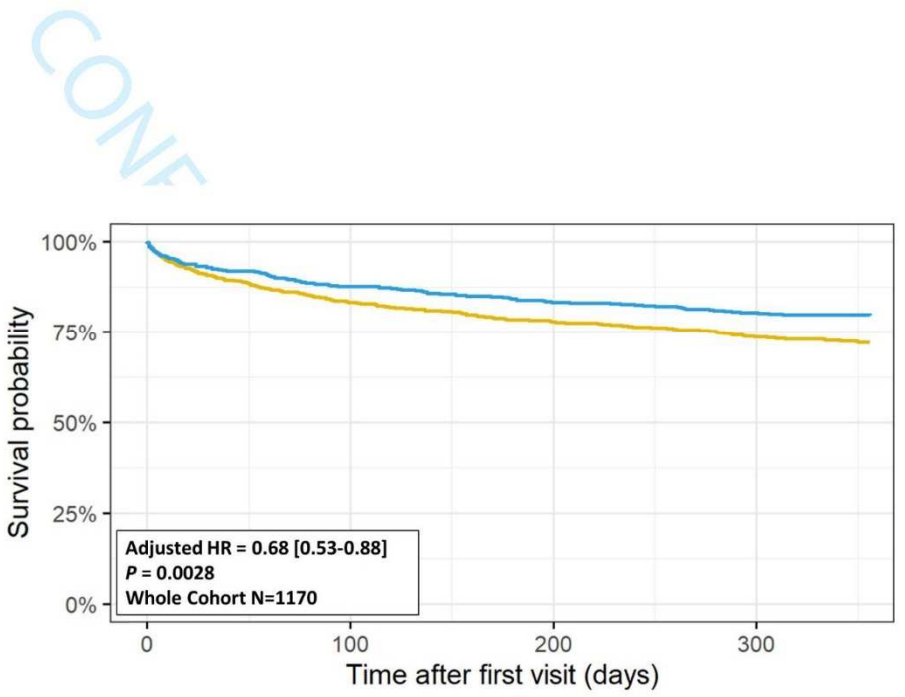


Figure 2B

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

CONFIDENTIAL

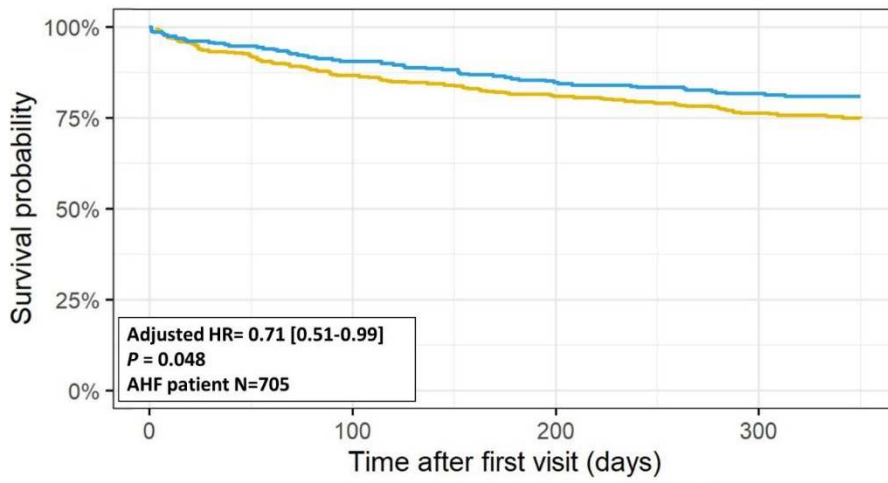


Figure 2C

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

CONFIDENTIAL

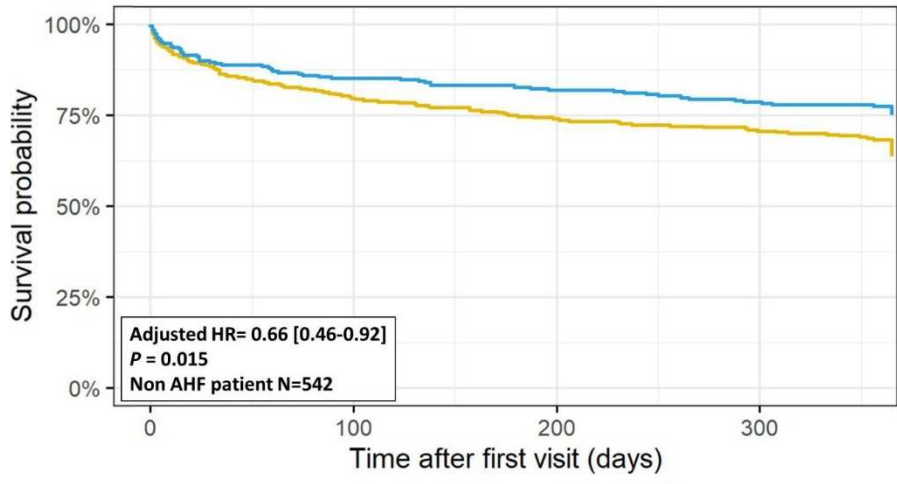


Figure 2D

view only

FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

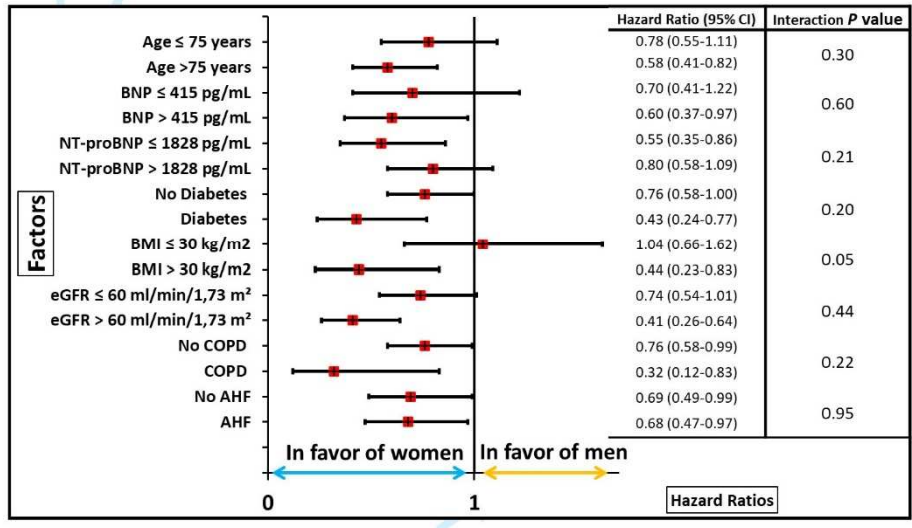


Figure 3



FIGURES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

CONFIDENTIAL

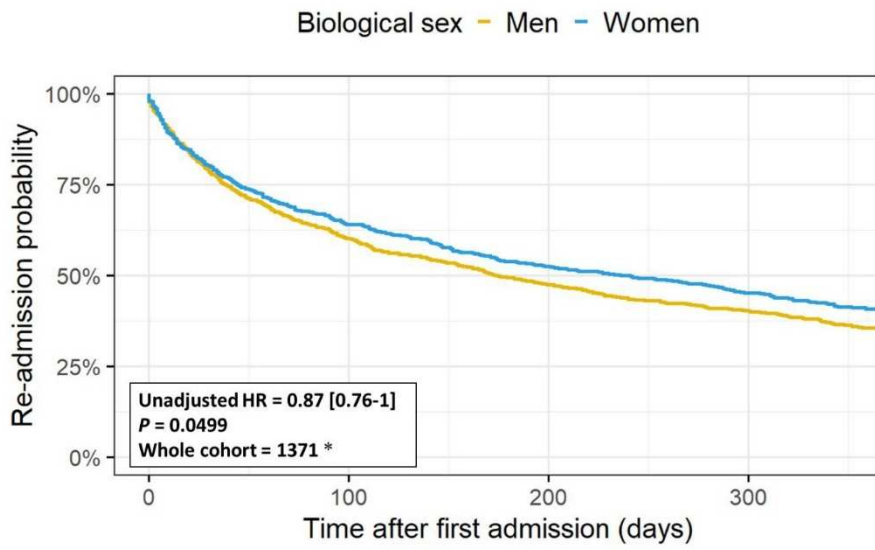


Figure 4

Review only