



**HAL**  
open science

# Rôle pronostique et physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire

Adrien Picod

► **To cite this version:**

Adrien Picod. Rôle pronostique et physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire. Biotechnologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5238 . tel-04703654

**HAL Id: tel-04703654**

**<https://theses.hal.science/tel-04703654v1>**

Submitted on 20 Sep 2024

**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 Paris Cité

École doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (ED 561)

Marqueurs cardiovasculaires en situation de stress (UMR-S 942)

# Rôle pronostique et physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire

Par Adrien PICOD

Thèse de doctorat de Biothérapies et Biotechnologies

Dirigée par Alexandre MEBAZAA et co-dirigée par Feriel AZIBANI

Présentée et soutenue publiquement le 28/11/2023

Devant un jury composé de :

Juliette HADCHOUEL, DR – Sorbonne Université	Rapporteuse
Pierre ASFAR, PU-PH – Université d'Angers	Rapporteur
Lara ZAFRANI, PU-PH – Université Paris Cité	Examinatrice
Bruno LEVY, PU-PH – Université de Lorraine	Examineur
Stéphane GAUDRY, PU-PH – Université Sorbonne Paris Nord	Membre invité
Alexandre MEBAZAA, PU-PH – Université Paris Cité	Directeur de thèse
Feriel AZIBANI, CR – Université Paris Cité	Co-directrice de thèse

## Résumé

### Rôle pronostique et physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire

**Introduction :** L'insuffisance circulatoire est une cause fréquente d'admission en réanimation, associée à une mortalité importante. Des travaux antérieurs ont démontré l'association entre une concentration de dipeptidyl peptidase 3 circulante (cDPP3) élevée et le pronostic à court terme des patients en insuffisance circulatoire. Nous avons fait l'hypothèse que cDPP3 jouait un rôle pathologique dans la genèse et/ou l'entretien de l'insuffisance circulatoire via son activité de clivage de peptides bioactifs, tels que les angiotensines et les enképhalines.

**Méthodes :** Deux approches ont été utilisées : 1. Sur le plan clinique, l'association entre cDPP3 et le pronostic a été analysée dans des populations de patients souffrant d'insuffisance circulatoire. 2. Sur le plan physiopathologique, les perturbations de l'hémodynamique systémique et rénale induites par cDPP3 ont été investiguées chez la souris. La relation entre les perturbations observées et la modulation du système rénine-angiotensine-aldostérone a été examinée.

**Résultats :** L'analyse des cohortes de patients a permis de confirmer l'association entre cDPP3 et le pronostic à court terme de l'insuffisance circulatoire. Dans la cohorte FROG-ICU, une association similaire entre concentration élevée de cDPP3 à l'inclusion et mortalité à J28 a été observée au cours du choc septique, cardiogénique, ou hémorragique. Dans la cohorte issue de l'essai ACCOST-HH, une concentration élevée de cDPP3 à l'inclusion était également associée à la mortalité à J30, à la durée du support cardiovasculaire ainsi qu'au recours à l'épuration extra-rénale ou à la ventilation mécanique invasive. Les patients chez qui la concentration de cDPP3 restait élevée à H72 avaient le plus mauvais pronostic. En comparaison, les patients ayant une concentration initialement haute mais décroissante de cDPP3 avaient une mortalité significativement réduite, comparable à celle des patients chez qui cDPP3 restait bas. Les patients dont la concentration de cDPP3 restait basse ou s'abaissait à H72 nécessitaient moins de supports d'organes. Chez la souris, l'administration de DPP3 purifié est associée à une augmentation significative du débit sanguin rénal alors que la pression artérielle n'est que peu affectée. L'administration de DPP3 était associée à une diminution significative des concentrations circulantes d'angiotensine II, III et IV en comparaison au contrôle. Une expérience de prétraitement par le valsartan a confirmé que l'effet rénovasculaire de DPP3 était secondaire à la diminution de la stimulation d'AT1R. L'administration de DPP3 était associée à une augmentation des concentrations circulantes de catécholamines endogènes. Une expérience de blocage adrénergique par le labétalol a démontré que ce relargage de catécholamines endogènes expliquait le maintien de la pression artérielle après administration de DPP3.

**Conclusion :** Ces résultats confirment la valeur pronostique de cDPP3 et confortent l'hypothèse d'un rôle pathologique de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire, via son activité de clivage des angiotensines. L'effet rénovasculaire suggère également l'implication de cDPP3 dans la genèse de la dysfonction rénale associée à l'insuffisance circulatoire. L'inhibition de cDPP3 pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique au cours de l'insuffisance circulatoire et devra faire l'objet d'investigations complémentaires.

**Mots clefs :** Dipeptidyl peptidase 3, insuffisance circulatoire, insuffisance rénale aiguë, débit sanguin rénal, catécholamines, système rénine-angiotensine-aldostérone

## Abstract

### **Prognostic and pathophysiological roles of circulating dipeptidyl peptidase 3 during circulatory failure.**

**Introduction:** Circulatory failure is a frequent cause of admission to the intensive care unit and is associated with significant mortality. Previous research has demonstrated the association between elevated circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) concentration and the short-term prognosis of patients with circulatory failure. We hypothesized that cDPP3 plays a pathological role in the development and/or maintenance of circulatory failure through its ability to cleave bioactive peptides such as angiotensins or enkephalins.

**Methods:** Two approaches were used: 1. On a clinical level, the association between cDPP3 and prognosis was analyzed in circulatory failure cohorts. 2. On a pathophysiological level, the hemodynamics changes induced by DPP3 in mice and the relation between the observed effects and renin-angiotensin system modulation were investigated.

**Results:** Analyses of patient cohorts confirmed the association between cDPP3 and short-term prognosis in circulatory insufficiency. In the FROG-ICU cohort, a similar association between elevated cDPP3 concentration at inclusion and 28-day mortality was observed in septic, cardiogenic, or hemorrhagic shock. In the ACCOST-HH trial cohort, a high cDPP3 concentration at inclusion was also associated with 30-day mortality, duration of cardiovascular support, and the need for renal replacement therapy or invasive mechanical ventilation. Patients with persistently high cDPP3 concentrations at H72 had the poorest prognosis. In contrast, patients with initially high but decreasing cDPP3 concentrations had significantly reduced mortality, comparable to those with persistently low cDPP3 concentration. Patients with persistently low or decreasing cDPP3 levels at H72 required less organ support. In mice, administration of purified DPP3 was associated with a significant increase in renal blood flow, while blood pressure was minimally affected. DPP3 administration was associated with a significant decrease in circulating concentrations of angiotensin II, III, and IV, compared to control. A pretreatment experiment with valsartan confirmed that the renovascular effect of DPP3 was secondary to reduced AT1R stimulation. DPP3 administration was associated with increased circulating endogenous catecholamines. Adrenergic blockade by labetalol demonstrated that DPP3-induced release of endogenous catecholamines is responsible for blood pressure maintenance.

**Conclusion:** These results confirm the prognostic value of cDPP3 and support the hypothesis of a pathological role for cDPP3 in circulatory failure through its angiotensin-cleaving activity. The renovascular effect observed also suggests the involvement of cDPP3 in the development of circulatory failure-associated acute kidney injury. Inhibition of cDPP3 may thus represent a therapeutic strategy and warrants further investigation.

**Keywords:** Dipeptidyl peptidase 3, circulatory failure, acute kidney injury, renal blood flow, catecholamines, renin-angiotensin-aldosterone system.

## Remerciements

Au Dr Juliette Hadchouel et au Pr Pierre Asfar,

Merci de l'intérêt porté à ce travail et du temps consacré à son examen en tant que rapporteurs. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Au Pr Lara Zafrani,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également de pour ton encadrement au lit du patient lors de mon passage à Saint-Louis.

Au Pr Bruno Levy,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire bénéficier de votre expertise.

Au Pr Stéphane Gaudry,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail que tu suis depuis ses débuts grâce aux comités de suivi de thèse. Je me réjouis de bientôt rejoindre le service et de la perspective de travailler ensemble sur de nouveaux projets.

Au Dr Ferial Azibani,

Merci d'avoir dirigé ce projet, pour ton encadrement quotidien, ta rigueur et tes conseils avisés. Merci tout particulièrement pour ta disponibilité dans les derniers moments de rédaction de ce travail que j'espère à la hauteur de tes espérances.

Au Pr Alexandre Mebazaa,

Merci de m'avoir confié ce projet et de l'avoir dirigé et pour vos remarques toujours pertinentes tout au long de sa réalisation. Puisse ce travail être à la hauteur de vos espérances et vous témoigner toute ma reconnaissance.

A tous ceux qui m'ont aidé à mener à bien ce projet,  
A toute l'unité 942. Merci tout particulièrement au groupe DPP3 : Noma, Hugo, Magali,  
Gwen, Nathan, Maxime, Pauline, Isabelle, Benjamin, Claire.  
Au Pr Jacques Callebert, pour la réalisation des dosages des catécholamines.  
A Sandrine Placier, merci pour sa dextérité et son aide inestimable dans la réalisation des  
manips d'hémodynamique.  
A nos collaborateurs internationaux : Le Pr Peter Pickkers, le Dr Antoine Herpain, le Dr Bruno  
Garcia et Le Dr Dirk Van Lier. Le Pr Mahir Karakas, le Dr Karine Bourgeois, Le Dr Oliver  
Hartmann, Le Dr Andreas Bergmann, et toute l'équipe de 4TEEN4.

A tout ceux qui ont contribué à ma formation médicale et scientifique, et notamment  
au Pr Yves Cohen pour sa confiance et son soutien sans cesse renouvelés ainsi qu'au Pr Paul  
Coppo et au Dr Fawzia Louache qui ont encadré mes premiers pas en laboratoire. Merci  
également aux équipes de la réanimation chirurgicale polyvalente de Lariboisière et de la  
réanimation médico-chirurgicale d'Avicenne.

A mes amis,

A ma famille,

Mes parents et mes frères et sœur, pour leur soutien de tout instant,

Mes grands-parents :

Gaby,

Mamie, Mamou et Papou. Je pense à vous.

A Audrey, merci d'être à mes côtés chaque jour. Je t'aime.

## Déclaration de liens d'intérêt

Dans le cadre d'une collaboration sur le projet DPP3, l'unité INSERM UMR-S 942 reçoit un financement de 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH.

## Table des matières

RESUME .....	2
ABSTRACT .....	3
REMERCIEMENTS.....	4
DECLARATION DE LIENS D'INTERET.....	6
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
ABREVIATIONS .....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	12
<b>1. Insuffisance circulatoire .....</b>	<b>12</b>
1.1 Définition et présentation clinique.....	12
1.2 Mécanismes en cause.....	13
1.3 Principes de prise en charge.....	15
<b>2. Conséquences rénales de l'insuffisance circulatoire .....</b>	<b>20</b>
2.1 Vascularisation rénale.....	20
2.2 Déterminants du débit de filtration glomérulaire .....	20
2.3 Autorégulation rénale.....	23
2.4 Variations du débit sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire au cours de l'insuffisance circulatoire .....	24
2.5 Conséquences thérapeutiques.....	27
<b>3. La dipeptidyl peptidase 3 .....</b>	<b>29</b>
3.1 Expression et localisation cellulaire.....	29
3.2 Structure .....	30
3.3 Régulation de l'expression de DPP3 .....	31
3.4 Activité enzymatique .....	31
3.5 Rôle non enzymatique : Implication dans la réponse anti-oxydante .....	33
3.6 Dipeptidyl peptidase 3 circulante en situation pathologique .....	35
<b>4. Le système rénine-angiotensine-aldostérone .....</b>	<b>39</b>
4.1 Description du système rénine-angiotensine-aldostérone .....	39
4.2 Le système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'insuffisance circulatoire .....	42
HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....	51

<b>PARTIE I. ROLE PRONOSTIQUE DE LA MESURE DE LA CONCENTRATION DE DIPEPTIDYL PEPTIDASE 3 CIRCULANTE AU COURS DE L'INSUFFISANCE CIRCULATOIRE.</b> .....	<b>53</b>
<b>1. Rôle pronostique de la concentration de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire : Résultats issus de la cohorte FROG-ICU.</b> .....	<b>53</b>
1.1 Introduction .....	53
1.2 <i>Research letter</i> , publiée dans le <i>British Journal of Anaesthesia</i> .....	55
1.3 Discussion .....	59
<b>2. Association entre la concentration de cDPP3, le recours aux supports d'organe et la mortalité au cours de l'état de choc cardiogénique : Une étude ancillaire de l'essai ACCOST-HH.</b> .....	<b>61</b>
2.1 Introduction .....	61
2.2 Article original, soumis à l' <i>European Heart Journal</i> .....	63
2.4 Discussion .....	88
<b>PARTIE II. ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE 3 AU COURS DE L'INSUFFISANCE CIRCULATOIRE.</b> .....	<b>91</b>
<b>3. Rôle potentiel de la dipeptidyl peptidase 3 circulante dans les altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'insuffisance circulatoire.</b> .....	<b>91</b>
3.1 Introduction .....	91
3.2 Correspondance, publiée dans l' <i>American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine</i> .....	92
3.3 Discussion .....	94
<b>4. Modulation de l'hémodynamique systémique et rénale par la dipeptidyl peptidase 3 circulante</b> .....	<b>95</b>
4.1 Introduction .....	95
4.2 Article original, en révision pour <i>Hypertension</i> .....	96
4.3 Discussion .....	130
<b>5. Modulation du système rénine angiotensine par la dipeptidyl peptidase 3 circulante</b> .....	<b>133</b>
5.1 Introduction .....	133
5.2 <i>Research letter</i> , soumise à l' <i>American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine</i> .....	134
5.3 Discussion .....	141
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>142</b>
<b>PERSPECTIVES GENERALES</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>150</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>173</b>
<b>Annexe 1. The renin-angiotensin-aldosterone in septic shock</b> .....	<b>173</b>
<b>Annexe 2. The CLIP-based mortality score in cardiogenic shock: suitable only for cardiogenic shock?</b> .....	<b>197</b>
<b>Annexe 3. Nomenclature des acides aminés</b> .....	<b>200</b>

## Liste des illustrations

Figure 1. Classification des mécanismes d'insuffisance circulatoire. ....	13
Figure 2. Représentation de la relation de Frank-Starling. ....	17
Figure 3. Influence des résistances afférentes et efférente sur le débit sanguin rénal et le débit de filtration glomérulaire .....	22
Figure 4. Autorégulation rénale .....	23
Figure 5. Hémodynamique glomérulaire au cours de différentes situations d'insuffisance circulatoire.....	26
Figure 6. Corrélation entre la concentration et l'activité circulante de DPP3. ....	36
Figure 7. Système rénine-angiotensine-aldostérone. ....	40
Figure 8. Régulation de la sécrétion de rénine.....	42
Figure 9. Perturbations du système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'état de choc distributif. ....	47

Sauf mention contraire, les figures ont été réalisées par l'auteur.

## Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux substrats de DPP3 d'intérêt en physiologie humaine. .... 33

Tableau 2. Principaux gènes régulés positivement par NRF2. .... 34

Sauf mention contraire, les tableaux ont été réalisées par l'auteur.

## Abréviations

SRAA : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

ECMO : *ExtraCorporeal Membrane Oxygenation*

DFG : Débit de filtration glomérulaire

$P_{CG}$  : Pression hydrostatique capillaire glomérulaire

$\pi_{CG}$  : Pression oncotique capillaire glomérulaire

(c)DPP3 : Dipeptidyl Peptidase 3 (circulante)

TOP : Thimet oligopeptidase

ARE : *Antioxydant response element*

(P)RR : *(Pro-)renin receptor*

ECA1 : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECA2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2

AT1R : Récepteur de l'angiotensine II de type 1

AT2R : Récepteur de l'angiotensine II de type 2

AT4R : Récepteur de l'angiotensine IV

IRAP : *Insulin-regulated aminopeptidase*

NEP : Neprilysine

ATRAP : *AT1R-associated protein*

ARAP1 : *AT1R-associated protein 1*

# Introduction générale

## 1. Insuffisance circulatoire

### 1.1 Définition et présentation clinique

L'insuffisance circulatoire peut être définie comme l'incapacité du système cardiovasculaire à assurer sa fonction, c'est-à-dire un apport suffisant de nutriments - dont le principal est l'oxygène - aux cellules; ainsi que l'épuration des produits finaux du métabolisme cellulaire - dont le principal est le dioxyde de carbone <sup>1</sup>.

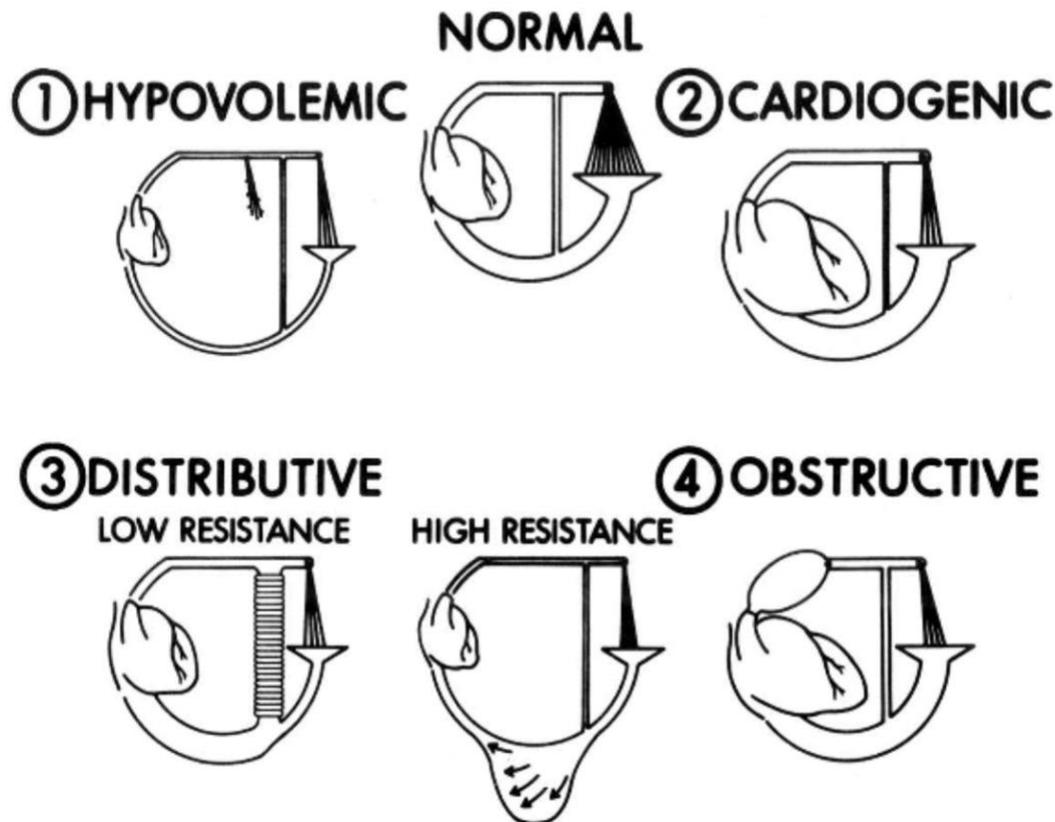
Les termes « état de choc » et « insuffisance circulatoire » peuvent être considérés comme interchangeables <sup>2</sup>. Le terme « choc » est la traduction littérale de l'anglais « *shock* » popularisé par Guthrie et provenant initialement de la traduction du terme français « saisissement », tel qu'utilisé en 1737 par Henri-François LeDran pour décrire les conséquences systémiques d'une hémorragie aiguë compliquant une plaie par arme à feu <sup>3-5</sup>.

L'insuffisance circulatoire se manifeste généralement par une hypotension artérielle et/ou un bas débit cardiaque associé à des signes cliniques et/ou biologiques d'hypoperfusion tissulaire <sup>6</sup>. L'hypoperfusion cutanée se traduit par des extrémités froides, des marbrures et un allongement du temps de recoloration capillaire <sup>7,8</sup>. Par ailleurs, bien que n'étant pas spécifiques de l'hypoperfusion, une diminution de la diurèse (oligurie) et/ou des signes neurologiques à type de somnolence ou d'obnubilation sont fréquemment retrouvés <sup>6</sup>.

Sur le plan biologique, l'insuffisance circulatoire s'accompagne classiquement d'une élévation de la lactatémie. Cette hyperlactatémie n'est pas seulement un témoin de l'hypoperfusion tissulaire et d'une déviation anaérobie du métabolisme. En effet, elle reflète également, et principalement, l'activation métabolique et donc l'intensité de la glycolyse et/ou la dysfonction mitochondriale liée à l'insuffisance circulatoire <sup>9-11</sup>. Quelle qu'en soit la cause, l'intensité de l'hyperlactatémie initiale mais aussi sa cinétique au cours des premières heures et jours de prise en charge sont directement liées au pronostic du patient en situation d'insuffisance circulatoire <sup>12,13</sup>. Si le seuil de 2 mmol/L est fréquemment utilisé dans la littérature et retenu dans les recommandations, il faut souligner que des élévations plus modérées de la lactatémie sont également associées à une altération du pronostic <sup>14-16</sup>.

## 1.2 Mécanismes en cause

D'après Weil et Shubin, l'insuffisance circulatoire résulte de 4 mécanismes primaires, non nécessairement exclusifs : hypovolémie, facteurs cardiogéniques, obstruction ou facteurs distributifs (**figure 1**)<sup>17</sup>. Dans une large cohorte de patients atteints d'insuffisance circulatoire, un mécanisme distributif était au premier plan dans deux tiers des cas, un mécanisme cardiogénique dans 16% des cas, hypovolémique dans 16% des cas tandis qu'un mécanisme obstructif n'était retrouvé que dans 2% des cas<sup>18</sup>.



**Figure 1. Classification des mécanismes d'insuffisance circulatoire.**

D'après Weil et Shubin<sup>17</sup>. L'insuffisance circulatoire distributive était initialement divisée en deux phénotypes. Le phénotype « high resistance » était alors décrit comme une atteinte exclusive du compartiment veineux, responsable d'une augmentation de la capacitance. Il est actuellement admis que toute insuffisance circulatoire distributive associe de façon variable une baisse des résistances vasculaires et une augmentation de la capacitance veineuse.

Les trois premiers mécanismes primaires d'insuffisance circulatoire sont caractérisés par une baisse du débit cardiaque et donc un transport en oxygène inadéquat. L'hypovolémie, c'est-à-dire la baisse du volume sanguin total peut résulter d'une perte de sang total en lien avec une hémorragie ; d'une contraction du secteur plasmatique en lien avec des pertes cutanées (brûlures étendues), digestives (diarrhées, vomissements) ou d'une extravasation du plasma en dehors du compartiment vasculaire en raison d'un phénomène de fuite capillaire. Alternativement, la baisse du débit cardiaque peut résulter de facteurs cardiogéniques, typiquement en lien avec une altération de la contractilité telle que rencontré lors de l'infarctus du myocarde. Plus rarement, le facteur cardiogénique est une anomalie du rythme cardiaque telle qu'une bradycardie extrême. Un mécanisme obstructif résulte de l'obstruction du flux sanguin dont la cause et la localisation varie : compression des cavités cardiaques droites par un pneumothorax ou un épanchement péricardique compressif, obstruction de la circulation pulmonaire par une embolie ou encore obstruction de la lumière aortique par une dissection <sup>17</sup>. Enfin, lorsque le mécanisme est distributif, le principal facteur pathologique est la baisse des résistances vasculaires. Si ce mécanisme est isolé, le débit cardiaque est élevé, par compensation. Les médiateurs responsables de la vasodilatation systémique sont nombreux, incluant notamment monoxyde d'azote <sup>19,20</sup>, peroxy-nitrite <sup>21</sup>, hydrogène sulfuré <sup>22,23</sup>, et prostaglandines <sup>24</sup>. Il est largement admis que la réaction inflammatoire est à l'origine de la production de ces médiateurs. Il est important de noter que l'atteinte du tonus vasculaire au cours de l'insuffisance circulatoire distributive est hétérogène. Ainsi peuvent co-exister une vasodilatation centrale responsable de la baisse des résistances vasculaires systémiques et une vasoconstriction artériolaire responsable d'un phénomène de shunt de la microcirculation et d'une ischémie distale <sup>17,25</sup>.

En fonction de la cause de l'insuffisance circulatoire, plusieurs mécanismes peuvent s'associer. Ainsi, au cours de l'état de choc septique, le mécanisme distributif est souvent au premier plan mais s'associe quasi-constamment à une composante hypovolémique secondaire à une fuite capillaire et/ou aux pertes cutanées insensibles liées à la fièvre, parfois associées selon le foyer infectieux à des pertes d'origine digestives. Plus rarement, une composante cardiogénique s'y associe sous la forme d'une cardiomyopathie septique. Au cours de l'anaphylaxie, le même profil peut être rencontré : distributif, hypovolémique et cardiogénique <sup>6</sup>. Enfin, un phénomène distributif s'associe parfois tardivement à un mécanisme autre. Ainsi

tout état de choc hypovolémique, cardiogénique ou obstructif initialement pur peut évoluer vers un état de choc complexe avec composante distributive surajoutée. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : production de facteurs vasodilatateurs secondaires à l'inflammation et au stress oxydant provoqué par les lésions tissulaires initiales ou la restauration brutale d'une perfusion tissulaire (phénomène d'ischémie-reperfusion)<sup>26</sup>, ou encore épuisement des systèmes de compensation endogènes : système sympathique<sup>27</sup>, système vasopressinergique<sup>28</sup> ou système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)<sup>29</sup>.

### 1.3 Principes de prise en charge

#### *Traitement étiologique*

Il repose sur le traitement de la cause initiale de l'insuffisance circulatoire. A titre d'exemples :

- le traitement étiologique du choc septique repose sur l'administration d'une antibiothérapie associée selon les cas au contrôle chirurgical ou interventionnel du foyer infectieux<sup>30</sup>.
- Au cours du choc cardiogénique secondaire à un infarctus du myocarde, la reperfusion coronaire doit être effectuée en urgence<sup>31</sup>.
- Au cours du choc hypovolémique secondaire à une hémorragie grave la priorité est donnée au contrôle du saignement<sup>32</sup>.
- Au cours du choc obstructif secondaire à une embolie pulmonaire proximale, la reperfusion pulmonaire via administration d'un fibrinolytique ou réalisation d'une embolectomie est prioritaire<sup>33</sup>.

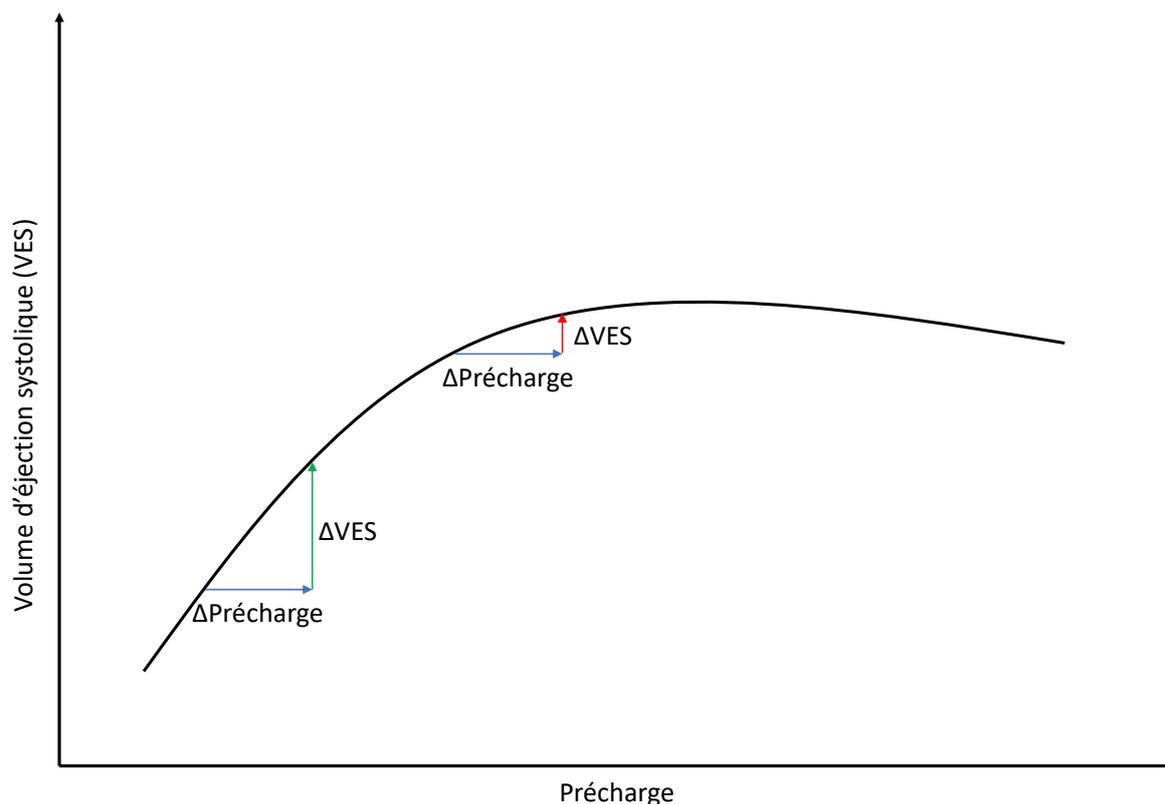
#### *Traitement symptomatique*

Dans l'attente de l'efficacité du traitement étiologique, un traitement symptomatique est mis en place sans délai pour maintenir la fonction du système cardiovasculaire, *i.e.*, maintenir un apport suffisant d'oxygène aux tissus. Dans cet objectif, la réanimation vise à maintenir un transport artériel en oxygène adéquat ainsi qu'une perfusion satisfaisante à l'échelle macro-

circulatoire et microcirculatoire. Une pression artérielle moyenne d'au moins 65 mmHg est habituellement ciblée, sur la base d'études rétrospectives et l'absence de bénéfice démontré d'une autre cible dans les essais randomisés <sup>34-39</sup>, exception faite du choc hémorragique où une stratégie d'hypotension permissive est adoptée dans l'attente du contrôle du saignement (pression artérielle moyenne comprise entre 50 et 60 mmHg), en l'absence de traumatisme crânien grave <sup>32,40</sup>. L'adéquation du transport artériel en oxygène aux besoins de l'organisme peut être appréciée par la mesure de la saturation veineuse centrale ou mêlée en oxygène <sup>6</sup>. Une réanimation adéquate s'accompagne habituellement d'une baisse progressive de la lactatémie. Au cours de l'état de choc septique, le suivi rapproché de la lactatémie, avec application d'une stratégie thérapeutique visant à une réduction d'au moins 20% toutes les deux heures a été associée à un bénéfice en terme de survie <sup>41</sup>. Néanmoins, une réanimation du choc septique guidée par le temps de recoloration capillaire pourrait s'avérer plus efficace <sup>42,43</sup>.

### Expansion volémique

L'administration de solutés dans le but d'améliorer le débit cardiaque et la perfusion des organes représente souvent la première mesure de prise en charge de l'insuffisance circulatoire. Cette stratégie repose sur l'exploitation de la relation de Frank-Starling liant la précharge cardiaque au volume d'éjection systolique (**figure 2**). Ainsi l'expansion volémique est au mieux guidée par la mesure du débit cardiaque et/ou motivée par des indices de précharge dépendance <sup>6,44</sup>. On utilise majoritairement des solutés cristalloïdes tels le chlorure de sodium à 0,9% ou le Ringer's lactate <sup>45</sup>.



**Figure 2. Représentation de la relation de Frank-Starling.**

D'après les travaux de Starling et Snarnoff <sup>46,47</sup>. Ainsi, pour un patient sur la portion ascendante de la courbe, dite de « pré-charge-dépendance », l'augmentation de la pré-charge, par exemple induite par l'expansion volémique, s'accompagne d'une augmentation du volume d'éjection systolique et donc du débit cardiaque. En revanche, pour un patient sur la portion horizontale de la courbe, dite de « précharge-indépendance », l'expansion volémique ne s'associe pas à une augmentation significative du volume d'éjection systolique.

### Vasopresseurs et inotropes

Les catécholamines, et en particulier la noradrénaline, représentent actuellement le traitement vasopresseur de première intention. La noradrénaline augmente le tonus vasculaire via son action sur les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, et dans une moindre mesure augmente la fréquence et la contractilité cardiaque via son action  $\beta$ -adrénergique. L'adrénaline exerce un effet  $\beta$ -adrénergique prédominant à faible dose, avec un effet  $\alpha$ -adrénergique croissant à mesure que la posologie augmente. L'effet  $\beta$ -adrénergique plus important en comparaison à la noradrénaline est associé à une activation métabolique plus importante avec une glycolyse accélérée responsable d'une élévation de la lactatémie, une tachycardie, une fréquence accrue d'arythmie ainsi qu'à une altération de la perfusion splanchnique <sup>11,48</sup>. Au cours du choc cardiogénique l'utilisation en première intention de l'adrénaline en comparaison

à la noradrénaline est associée à un risque plus élevé de développer un choc cardiogénique réfractaire <sup>49</sup>.

La dobutamine possède un effet  $\beta$ -adrénergique isolé et donc des propriétés inotropes et vasodilatatrices. Elle est utilisée, généralement en adjonction à la noradrénaline, dans des situations où le débit cardiaque est inadéquat. Son utilisation à titre systématique dans le but de maximiser le transport artériel en oxygène est associée à une surmortalité <sup>50</sup>. L'utilisation de la dopamine est quasi-abandonnée puisque associée à un surrisque d'arythmie et à une surmortalité <sup>18,51</sup>.

L'utilisation des autres catécholamines telles que la phényléphrine, l'éphédrine ou le métaraminol est relativement marginale dans le cadre de l'insuffisance circulatoire de réanimation. Des données indirectes, provenant de l'analyse rétrospective d'une situation de pénurie de noradrénaline aux Etats-Unis, suggèrent que son remplacement par une autre molécule, majoritairement la phényléphrine est associée à une surmortalité <sup>52</sup>.

Cependant, les catécholamines ont été associées à des effets indésirables, notamment une fréquence accrue d'arythmie, une toxicité myocardique directe, des effets immunosuppresseurs ainsi qu'une croissance bactérienne accrue <sup>53-57</sup>. Ces observations ont motivé l'investigation d'alternatives thérapeutiques. Deux vasopresseurs non catécholaminergiques sont actuellement proposés : La vasopressine et l'angiotensine II.

L'utilisation de la vasopressine au cours de l'insuffisance circulatoire à composante distributive est motivée par la mise en évidence d'un épuisement rapide des stock hypophysaires de cette hormone vasoconstrictrice <sup>28</sup>, responsable de concentrations plasmatiques inadaptées au degré d'hypotension au cours du choc septique ou de la vasoplégie post-chirurgie cardiaque <sup>58-61</sup>. Son utilisation a été évaluée dans plusieurs essais randomisés. Un bénéfice a été démontré en comparaison à la noradrénaline en post-opératoire de chirurgie cardiaque sur un critère composite associant mortalité et complication sévères <sup>62</sup>. Au cours du choc septique, son bénéfice n'a pas été formellement démontré par les essais randomisés contrôlés ayant évalué son utilisation <sup>63-66</sup>. La fréquence des effets indésirables paraît similaire à la noradrénaline avec néanmoins un profil différent : plus de fibrillation atriale avec la noradrénaline et plus d'ischémie digitale avec la vasopressine <sup>67</sup>.

L'utilisation de l'angiotensine II est également motivée par l'hypothèse d'un défaut de signalisation (voir chapitre III). A ce jour, une seule étude randomisée de grande envergure a évalué l'administration d'angiotensine II au cours de l'insuffisance circulatoire à prédominance distributive, en adjonction au support vasopresseur déjà en place <sup>68</sup>. Dans cette étude, le critère de jugement principal, l'augmentation de la pression artérielle, a été atteint plus fréquemment que lors du traitement par placebo. La mortalité, critère de jugement secondaire ne différait pas selon le bras de randomisation et il reste donc à démontrer un éventuel bénéfice clinique de l'administration d'angiotensine II.

#### Vasodilatateurs

L'administration de vasodilatateurs, à première vue paradoxale au cours de l'état de choc distributif, vise à lever le shunt de la microcirculation <sup>25,69</sup>. L'administration systématique de nitroglycérine tend à aggraver le pronostic <sup>70</sup>. L'iloprost, un analogue de la prostacycline ayant une action préférentielle sur le segment artériolaire est actuellement évalué au cours de l'état de choc septique <sup>71,72</sup>

#### Assistance circulatoire mécanique

En cas de défaillance cardiaque sévère, une assistance circulatoire mécanique temporaire peut être mise en place. Cette stratégie ne se conçoit que dans l'attente d'une récupération cardiaque spontanée (*bridge to recovery*) ou d'une option plus définitive telle qu'une assistance de longue durée (*bridge to destination therapy*) ou une transplantation myocardique (*bridge to transplantation*). Plusieurs dispositifs sont disponibles, les plus couramment utilisés étant le ballon de contre-pulsion intra-aortique, l'assistance monoventriculaire de type Impella® ou l'*ExtraCorporal Membrane Oxygenation* (ECMO) veino-artérielle. Il faut souligner que ces techniques sont associées à la survenue de complications hémorragiques et/ou ischémiques sévères et qu'aucune n'a prouvé son bénéfice de façon formelle <sup>73,74</sup>.

## 2. Conséquences rénales de l'insuffisance circulatoire

### 2.1 Vascularisation rénale

Chaque rein est alimenté par une artère rénale, habituellement unique, issue de l'aorte. L'artère rénale se divise en artères segmentaires qui elles-mêmes se divisent en artères inter-lobaires, puis en artères arquées. Les artères arquées ont une course parallèle à la surface du rein et donnent naissance aux artères inter-lobulaires dont naissent les artérioles glomérulaires afférentes. La vascularisation glomérulaire est de type admirable, composée d'un réseau capillaire glomérulaire interposé entre l'artériole afférente et une artériole efférente. Les artérioles efférentes donnent naissance aux capillaires péri-tubulaires et, au niveau des néphrons juxtamédullaires, aux vasa recta, entourant l'intégralité de l'anse de Henle. Les capillaires péri-tubulaires et les vasa recta débouchent dans les veinules qui se rejoignent pour former des veines, qui cheminent adjacentes aux artères correspondantes et se réunissent pour former une veine rénale, habituellement unique qui se jette dans la veine cave inférieure.

Chez l'homme, le débit sanguin rénal correspond en situation d'homéostasie à environ 20% du débit cardiaque. Le débit de filtration glomérulaire (DFG), correspondant au volume de plasma filtré par unité de temps par l'ensemble des glomérules correspond à environ 120mL/min.

### 2.2 Déterminants du débit de filtration glomérulaire

A l'échelle glomérulaire, le DFG est déterminé par plusieurs facteurs :

- La surface de filtration, modulée - entre autres - par la contraction des cellules mésangiales.
- La perméabilité de la membrane capillaire.

- La pression nette d'ultrafiltration obéissant à la loi de Starling, selon l'équation :

$$P_{UF} = (P_{CG} - P_U) - (\pi_{CG} - \pi_U)$$

Où :

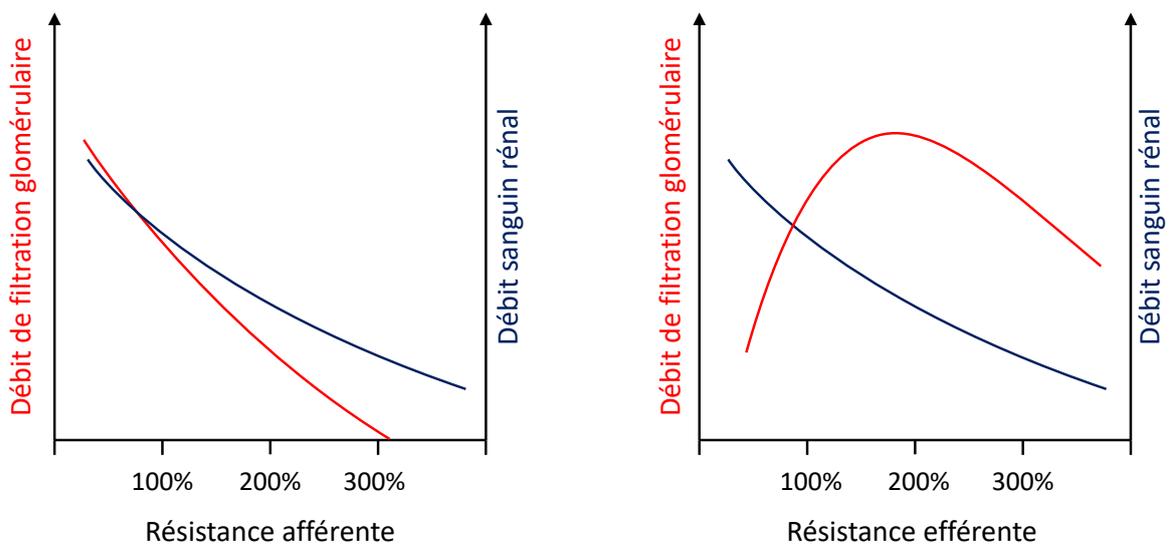
- $P_{CG}$  est la pression hydrostatique dans le capillaire glomérulaire, considérée comme stable le long du capillaire en raison de la très faible résistance à l'écoulement du sang.
- $P_U$  la pression hydrostatique dans la chambre urinaire, minime en dehors d'un phénomène obstructif.
- $\pi_{CG}$  la pression oncotique dans le capillaire glomérulaire, augmentant progressivement le long du capillaire en raison de l'hémoconcentration liée à l'ultrafiltration du plasma.
- $\pi_U$  la pression oncotique dans la chambre urinaire, habituellement négligeable.

Le débit sanguin glomérulaire est lié au DFG par l'intermédiaire de la pression oncotique ( $\pi_{CG}$ ). En effet, un débit sanguin élevé limite l'augmentation de la  $\pi_{CG}$  secondaire à l'hémoconcentration liée à l'ultrafiltration du plasma le long du capillaire glomérulaire. En conditions homéostatique, un débit sanguin suffisant permet que l'élévation du gradient de pression oncotique n'atteigne jamais la valeur du gradient de pression hydrostatique, de sorte que la filtration ne s'annule jamais le long du capillaire glomérulaire, réalisant une situation dite de « déséquilibre de filtration ». Lorsque le débit sanguin baisse, par exemple lors d'une déplétion volémique, l'équilibre de filtration est atteint et la filtration s'annule avant la fin du capillaire glomérulaire <sup>75</sup>.

La pression capillaire glomérulaire ( $P_{CG}$ ) est un déterminant majeur de la filtration glomérulaire. Cette pression est dépendante du débit d'amont et surtout, sous la dépendance étroite du rapport des résistances artériolaires afférentes et efférentes, de sorte que, toutes choses égales par ailleurs, la vasoconstriction de l'artériole afférente entraîne une diminution de  $P_{CG}$  et donc du DFG alors qu'une vasoconstriction de l'artériole efférente entraîne une augmentation de  $P_{CG}$  et donc du DFG.

Néanmoins, la variation des résistances artériolaires contribue également à la variation du débit sanguin glomérulaire, de sorte que toute baisse de résistance (afférente et/ou efférente) tend à augmenter le débit sanguin. L'effet combiné des variations de pression hydrostatique et de débit sanguin induites par la variation de résistance se traduit ainsi par :

- Une relation inverse entre résistance artériolaire afférente et DFG : La vasoconstriction de l'artériole afférente entraînant à la fois une baisse du débit sanguin et de la  $P_{CG}$ , le DFG diminue avec l'augmentation de la résistance afférente (**figure 3**).
- Une relation biphasique entre résistance artériolaire efférente et DFG : La vasoconstriction de l'artériole efférente entraînant initialement une augmentation du DFG secondaire à l'augmentation de  $P_{CG}$  puis une diminution, à mesure que le débit sanguin baisse (**figure 3**).

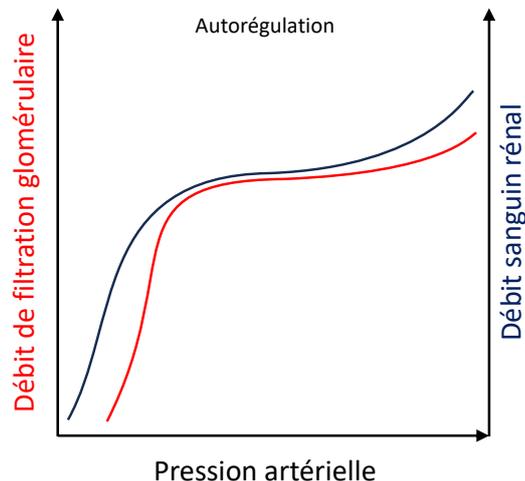


**Figure 3. Influence des résistances afférentes et efférentes sur le débit sanguin rénal et le débit de filtration glomérulaire**

Adapté d'après <sup>1</sup>.

### 2.3 Autorégulation rénale

L'autorégulation rénale correspond à la capacité du rein à maintenir un débit sanguin, et un DFG constants malgré des variations de pression de perfusion rénale (**figure 4**). En dehors de la plage d'autorégulation, le débit sanguin rénal et le DFG varient de manière monotone avec la pression de perfusion rénale. Cette plage d'autorégulation est influencée par de nombreux facteurs, de sorte qu'il est difficile de donner des valeurs seuil. Chez l'homme, une valeur de pression artérielle moyenne allant de 60 à 110 mmHg est souvent citée sans que des données solides appuient ces chiffres.



**Figure 4. Autorégulation rénale**

Débit sanguin rénal et débit de filtration glomérulaire sont maintenus constants pour une plage de pression artérielle donnée. Adapté d'après <sup>1</sup>.

L'auto-régulation rénale est sous la dépendance de 2 mécanismes principaux :

- Le réflexe myogénique, correspondant à une vasoconstriction réflexe de l'artériole afférente en réponse à l'étirement pariétal secondaire à l'augmentation de pression artérielle. Cette vasoconstriction limite le flux d'aval et régule la  $P_{CG}$ .
- Le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire, couplant le débit de chlore dans la branche ascendante de l'anse de Henle à la production d'adénosine entraînant également la contraction de l'artériole afférente <sup>76</sup>.

Plusieurs facteurs vasoactifs modulent l'autorégulation rénale et notamment :

- Les prostaglandines et le monoxyde d'azote exercent un effet vasodilatateur préférentiel sur l'artériole afférente <sup>77-79</sup>.
- L'angiotensine II et la vasopressine exercent un effet vasoconstricteur préférentiel sur l'artériole efférente <sup>80,81</sup>. Néanmoins, elles favorisent également la contraction des cellules mésangiales, réduisant la surface de filtration <sup>82,83</sup>.
- La noradrénaline exerce un effet vasoconstricteur à la fois sur les segments pré- et post-glomérulaires, entraînant une diminution du débit sanguin rénal chez l'homme et l'animal sains, sans modification notable du DFG <sup>81,84,85</sup>.

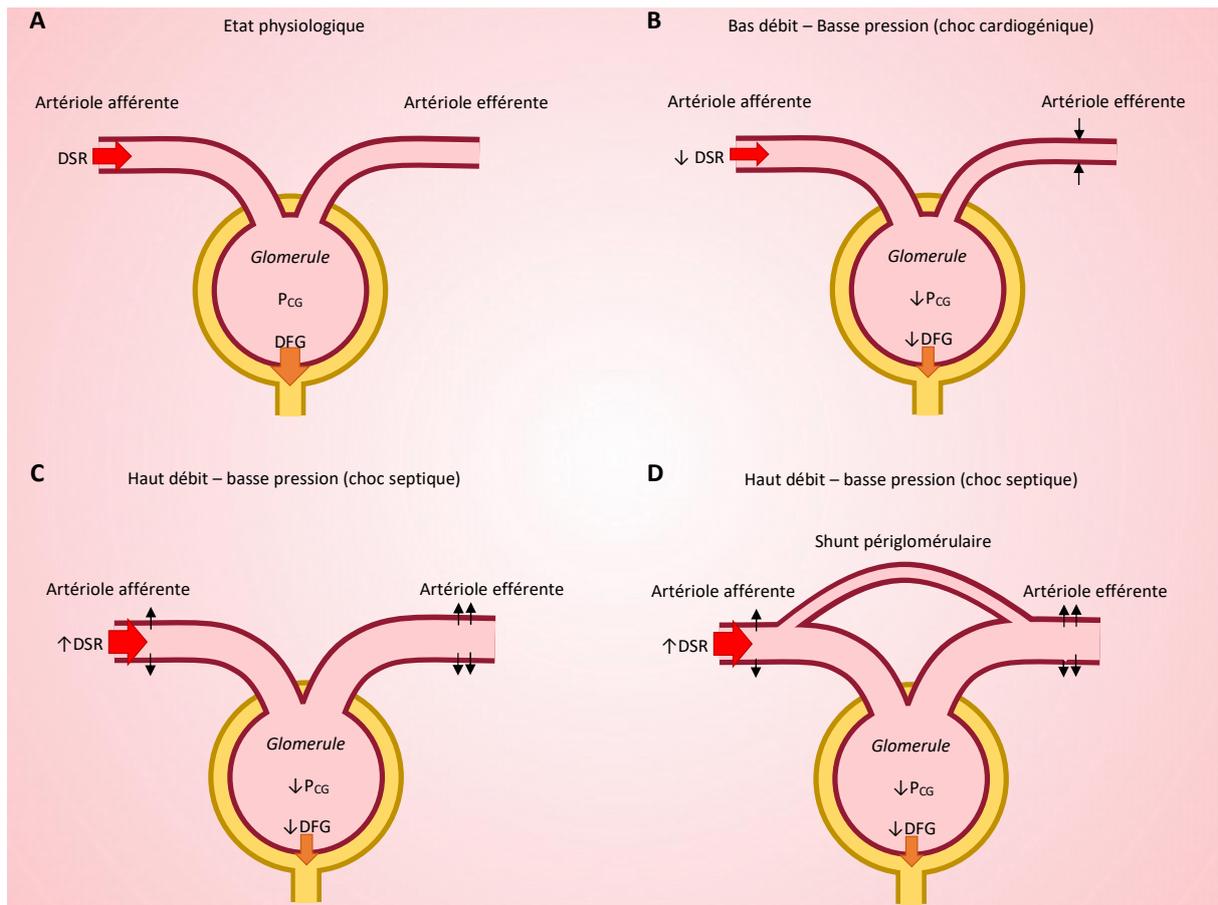
De manière importante, il faut noter que l'effet de ces médiateur, en particulier lorsqu'ils sont administrés ou antagonisés par voie systémique, dépend non seulement des effets locaux (action sur le tonus vasomoteur de l'artériole afférente et/ou efférente) mais également des effets systémiques (modification de la pression de perfusion rénale, susceptible d'engager le réflexe myogénique) ainsi que de l'éventuelle mise en jeu de systèmes visant à compenser les modifications hémodynamiques induites.

#### 2.4 Variations du débit sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire au cours de l'insuffisance circulatoire

Dans le contexte d'une insuffisance circulatoire à bas débit cardiaque – basse pression artérielle (mécanismes hypovolémique, cardiogénique ou obstructif), la vasodilatation myogénique réflexe de l'artériole afférente et les facteurs vasoconstricteurs de l'artériole efférente tendent dans un premier temps à maintenir une  $P_{CG}$  suffisante pour maintenir la pression nette d'ultrafiltration et donc le DFG. Lorsque ces mécanismes sont dépassés, le débit sanguin rénal, la  $P_{CG}$  et le DFG s'effondrent (**figure 5**).

Au cours de l'insuffisance circulatoire distributive, les données disponibles sont plus hétérogènes de sorte qu'une conclusion définitive est plus difficile.

Lorsque le mécanisme distributif est isolé, en pratique lorsqu'une éventuelle composante hypovolémique est corrigée à la phase initiale du sepsis, le débit sanguin rénal est augmenté <sup>86</sup>. En effet, les facteurs distributifs affectent également la circulation rénale et le débit sanguin rénal s'élève en réponse à la chute des résistances rénovasculaires <sup>86</sup>. Néanmoins, ce haut débit sanguin rénal s'associe fréquemment à une altération de la fonction. Cette dissociation ne peut être expliquée que par une vasodilatation préférentielle de l'artériole efférente, entraînant une diminution de la  $P_{CG}$  et finalement une diminution du DFG (**figure 5**). L'atteinte préférentielle de l'artériole efférente suggère que les facteurs vasoconstricteurs préférentiels du segment post-glomérulaire s'opposent insuffisamment aux facteurs vasodilatateurs. Ainsi, dans les modèles expérimentaux d'insuffisance rénale aiguë septique, l'administration d'angiotensine II est associée à une normalisation du débit sanguin rénal et à une amélioration du DFG <sup>87,88</sup>. Une hypothèse complémentaire pour expliquer le découplage débit – fonction au cours de l'insuffisance rénale des états de choc distributifs serait la réouverture de shunts péri-glomérulaires (**figure 5**). Bien que l'existence de telles structures shuntant le glomérule aient été démontrée chez l'animal sain <sup>89</sup>, leur implication au cours de l'insuffisance rénale aiguë reste à prouver. Néanmoins, une vasodilatation préférentielle de l'artériole efférente serait susceptible de favoriser un shunt périglomérulaire, le flux sanguin empruntant préférentiellement la zone de moindre résistance. L'absence de modification histologique significative au cours de la phase précoce de l'insuffisance rénale aiguë du sepsis supporte un rôle majeur de ces modifications hémodynamiques <sup>87,90</sup>.



**Figure 5. Hémodynamique glomérulaire au cours de différentes situations d'insuffisance circulatoire.** État basal (A). Au cours d'une insuffisance circulatoire caractérisée par un bas débit cardiaque (par exemple, choc cardiogénique), la vasodilatation myogénique réflexe de l'artériole afférente et les facteurs vasoconstricteurs de l'artériole efférente tendent dans un premier temps à maintenir une PCG suffisante pour maintenir la pression nette d'ultrafiltration et donc le DFG. Lorsque ces mécanismes sont dépassés, le débit sanguin rénal, la PCG et le DFG s'effondrent (B). Au contraire, au cours d'une insuffisance circulatoire distributive, caractérisée par un haut débit cardiaque (par exemple, choc septique), la vasodilatation préférentielle de l'artériole efférente explique la chute de la PCG et donc du DFG malgré un DSR élevé (C). Additionnellement, la réouverture de shunts péri-glomérulaires, potentiellement favorisée par la vasodilatation post-glomérulaire, est susceptible de participer au découplage DSR – DFG observée au cours de l'insuffisance rénale aiguë associée à l'insuffisance circulatoire distributive (D). DSR : Débit sanguin rénal, PCG : Pression capillaire glomérulaire, DFG : Débit de filtration glomérulaire.

A la phase tardive, les mécanismes mis en jeu sont plus divers.

Il a été montré dans des modèles animaux que l'inflammation telle qu'engendrée par un sepsis pouvait être responsable d'une altération de la perméabilité glomérulaire, en raison de lésions endothéliales et/ou épithéliales<sup>91,92</sup>. La présence possible de lésions tubulaires associées entraîne, via l'accumulation de débris cellulaires dans la lumière tubulaire, une augmentation de la pression hydrostatique dans la chambre urinaire, s'opposant à la PCG et limitant la filtration. Les lésions tubulaires sont responsables d'un défaut de réabsorption avec

notamment persistance d'une charge en chlore urinaire qui engendre une activation pathologique du rétro-contrôle tubulo-glomérulaire responsable d'une limitation du débit sanguin rénal par vasoconstriction de l'artériole afférente. Le débit sanguin rénal peut être d'autant plus réduit que la pression de perfusion rénale diminue en raison d'une augmentation de la pression d'aval. Cette augmentation de la pression d'aval peut ainsi résulter d'une élévation de la pression veineuse centrale, conséquence d'une réanimation liquidienne excessive et/ou d'une dysfonction cardiaque co-existante<sup>93-95</sup>; ou d'un syndrome compartimental abdominal<sup>96</sup>.

## 2.5 Conséquences thérapeutiques

Les mécanismes précédemment développés soulignent la nécessité de maintenir un débit systémique suffisant et une pression de perfusion rénale adéquate au cours de l'insuffisance circulatoire. Néanmoins, il est difficile de définir cette pression de perfusion idéale qui peut varier en fonction du contexte et du niveau de préservation des mécanismes d'autorégulation. Au cours du choc septique, l'essai SEPSISPAM a suggéré qu'une cible de pression artérielle plus élevée (80 à 85 mmHg) pouvait être associée à un bénéfice rénal dans le sous-groupe des patients préalablement hypertendus : moins de doublement de la créatininémie, moins de recours à l'épuration extra-rénale<sup>36</sup>. Néanmoins, l'existence d'une interaction complexe avec le traitement anti-hypertenseur pris au long cours et l'absence de confirmation à ce jour incitent à la prudence dans l'interprétation de ce résultat<sup>97</sup>.

La concentration en chlore dans la branche ascendante de l'anse de Henle étant le stimulus du rétro-contrôle tubulo-glomérulaire, l'utilisation de solutés riches en chlore tels que le NaCl 0,9%, pourrait théoriquement s'associer à une vasoconstriction de l'artériole afférente, une baisse de la  $P_{CG}$  et donc une baisse du DFG. Chez le volontaire sain, l'administration de NaCl 0,9% entraîne en effet une vasoconstriction de l'artère rénale qui n'est pas retrouvée avec un soluté balancé, moins riche en chlore (Plasma-lyte® 148)<sup>98</sup>. En revanche dans un modèle murin de choc septique, une réanimation liquidienne basée sur le NaCl 0,9%, bien qu'à l'origine d'une hyperchlorémie n'affecte ni l'hémodynamique rénale ni la sévérité de l'insuffisance rénale en comparaison avec le Plasmalyte®<sup>99</sup>. Il semblerait néanmoins que chez le patient de réanimation, l'utilisation préférentielle d'un soluté balancé soit associée à une réduction très

modeste du risque composite de décès, recours à l'épuration extra-rénale ou d'insuffisance rénale persistante à J30 <sup>98</sup>.

Enfin, l'utilisation de vasoconstricteurs ayant un effet préférentiel sur l'artériole efférente, tels que la vasopressine ou l'angiotensine II pourrait - en théorie - permettre une meilleure  $P_{CG}$  et une optimisation de la filtration glomérulaire. Ainsi l'utilisation de la vasopressine au cours du choc septique semble être associée à un moindre recours à l'épuration extra-rénale <sup>67</sup>. Alternativement ou de manière complémentaire, l'angiotensine II pourrait également être administrée avec le même objectif (voir chapitre 4).

### 3. La dipeptidyl peptidase 3

La dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) (3.4.14.4 selon la nomenclature de l'*International Union of Biochemistry and Molecular Biology Enzyme Commission* [EC]<sup>100</sup>), aussi appelée dipeptidyl aryl-aminase 3<sup>101</sup> ou dipeptidyl aminopeptidase 3<sup>102</sup> est une métallo-peptidase de 80-85 kDa. Il s'agit du troisième membre identifié d'une famille hétérogène de protéines ayant en commun une activité enzymatique de clivage d'un dipeptide (EC 3.4.14.X) et/ou une parenté structurelle. Cette famille est composée de 8 membres chez les mammifères : DPP1, DPP2, DPP3, DPP4, DPP6, DPP8, DPP9, DPP10, auxquels s'ajoutent la DPP5 et la DPP11, exclusivement retrouvées chez les bactéries ou les champignons<sup>103,104</sup>.

DPP3 est une enzyme très conservée au sein du vivant puisqu'un homologue a été mis en évidence chez la quasi-totalité des espèces eucaryotes et chez certains procaryotes, incluant : l'Homme<sup>105</sup>, les rongeurs et lagomorphes<sup>102,106,107</sup>, les bovins, ovins et porcins<sup>108-110</sup>, mais aussi l'insecte tel la drosophile<sup>111</sup>, des parasites tels *Schistosoma*<sup>112</sup>, *Leishmania*<sup>113</sup> ou *Entamoeba histolytica*<sup>114</sup>, des champignons tels *Saccharomyces cerevisiae*<sup>115</sup> ou des bactéries comme *Bacteroides thetaiotaomicron*<sup>116</sup>.

#### 3.1 Expression et localisation cellulaire

DPP3 a été isolée initialement à partir de l'hypophyse bovine<sup>101</sup>. Les travaux suivants ont démontré le caractère ubiquitaire de son expression, retrouvée dans l'ensemble des tissus de l'organisme<sup>102</sup>.

A l'échelle cellulaire, DPP3 a été décrite initialement comme une protéine intracellulaire, principalement de localisation cytoplasmique<sup>117</sup>. Une localisation nucléaire a également été décrite, en particulier dans des conditions de stress oxydant<sup>118</sup>. Néanmoins, une activité membranaire a été mise en évidence chez certaines espèces<sup>102,111</sup> mais à ce jour jamais chez l'Homme. Les mécanismes susceptibles d'aboutir à l'expression membranaire de la protéine restent obscurs, la structure primaire de DPP3 ne possédant ni peptide signal ni domaine (trans)membranaire. Plusieurs études ont démontré que des modifications post-traductionnelles de protéines cytosoliques pouvaient favoriser l'adressage à la membrane, tels

la phosphorylation ou la myristoylation <sup>119</sup>. En accord avec cette hypothèse, DPP3 possède un site de phosphorylation ainsi que plusieurs sites de myristoylation <sup>120</sup>.

Enfin, DPP3 est détectable dans les fluides biologiques et notamment le plasma <sup>121</sup>, le liquide séminal <sup>122</sup>, amniotique <sup>105</sup>, ou cérébro-spinal <sup>123</sup>. Les mécanismes associés au relargage de DPP3 hors du compartiment cellulaire restent insuffisamment explorés mais pourraient impliquer la mort cellulaire, notamment via la voie Fas-FasL <sup>124</sup>. Chez les patients, l'existence d'une forte corrélation entre la concentration de cDPP3 et celle de marqueurs « lytiques » tels l'aspartate aminotransférase ou la lactate déshydrogénase supporte cette relation avec la mort cellulaire <sup>125,126</sup>

### 3.2 Structure

DPP3 est une protéine de 80 à 85 kDa composée de 737 acides aminés chez l'Homme. La séquence exacte des acides aminés varie beaucoup selon les espèces, de moins de 40% d'homologie avec la séquence humaine pour DPP3 fongique à plus de 80% pour DPP3 murin. En revanche la structure tridimensionnelle de DPP3 est très conservée <sup>116,127,128</sup>. La protéine est formée de deux domaines connectés par une région charnière. Le site de liaison au substrat est situé au sein de la fente séparant les deux domaines.

Le domaine supérieur, composé principalement d'hélices alpha comporte un site de liaison au zinc, tandis que le domaine inférieur est formé d'un assemblage de structures alpha et béta. Plusieurs motifs très conservés, tous situés au sein du domaine supérieur, participent aux fonctions de DPP3. Les métallopeptidases sont habituellement caractérisées par un site catalytique ayant le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His\*. DPP3, en revanche possède un site His-Glu-Xaa-Xaa-Gly-His, faisant exception au sein des métallopeptidases <sup>130</sup>. Les deux résidus histidine de ce site participent à la coordination d'un ion zinc, essentiel au fonctionnement de DPP3 <sup>131</sup>. Un second site de motif Glu-Glu-Xaa-Arg-Ala-Glu/Asp complète la liaison au zinc via les trois résidus acides glutamique <sup>128</sup>. Un troisième motif conservé, Glu-Thr-Gly-Glu, est impliqué dans les fonctions non enzymatiques de DPP3 <sup>132</sup>, détaillées plus loin.

---

\* Les acides aminés sont désignés selon la nomenclature et les recommandations de l'IUPAC-IUB par leur code à 3 lettres dans l'ensemble du document, à l'exception des figures où le code à une lettre a été préféré <sup>129</sup>.

### 3.3 Régulation de l'expression de DPP3

Le gène de DPP3 chez l'Homme est situé sur le chromosome 11. Il contient 28 kb et comporte 17 exons. Les facteurs régulant l'expression génique de DPP3 restent mal connus. Le promoteur de DPP3 contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription suivants : Ets1/Elk1, NF-κB, CREB, USF, C/EBP, CdxA et c-Rel. Dans une lignée de glioblastome, le facteur de transcription Elk1 dont la phosphorylation et la translocation nucléaire sont induites par ERK1 en aval de la voie MAPK semblait être un des facteurs déterminants de la régulation transcriptomique de DPP3<sup>133</sup>. Additionnellement, l'œstradiol régule positivement l'expression de DPP3 à un stade post-transcriptionnel<sup>134</sup>.

### 3.4 Activité enzymatique

DPP3 est une exo-aminopeptidase, clivant séquentiellement un dipeptide de l'extrémité non substituée d'un grand nombre d'oligopeptides de 3 à 10 acides aminés. Les meilleurs substrats ont une taille de 3 à 8 acides aminés et les dipeptides Arg-Arg, Ala-Arg, Asp-Arg et Tyr-Gly sont préférentiellement clivés<sup>135</sup>.

L'activité de DPP3 envers un substrat synthétique est maximale à pH alcalin (8,0-9,0). En revanche, l'activité de clivage de ses substrats naturels semble maximale à pH physiologique (7,0-7,5)<sup>117,136</sup>.

#### *Rôle de protéase non spécifique*

Les protéines cellulaires destinées à l'élimination sont dégradées via le système ubiquitine-protéasome et les peptides en résultant sont relargués dans le cytosol. Ces peptides sont ensuite dégradés par un ensemble de peptidases en leurs acides aminés constituants. Les peptides de plus de 16 résidus sont dégradés par la tripeptidyl peptidase 2. Les peptides de 6 à 16 acides aminés sont hydrolysés préférentiellement par la Thimet oligopeptidase (TOP). Les peptides en résultant sont ensuite dégradés par l'action cumulée d'aminopeptidases telles l'aminopeptidase N, la leukotriène A4 hydrolase, la bléomycine hydrolase et l'aminopeptidase sensible à la puromycine. La répartition ubiquitaire de DPP3 et son activité de clivage

relativement peu spécifique rendent vraisemblable sa participation au renouvellement protéique intracellulaire <sup>137</sup>.

DPP3 a ainsi été impliquée dans la dégradation d'oligopeptides destinés à être présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigène. En effet, la présence de DPP3 ou de TOP au sein de cellules nécrotiques prévient la trans-présentation des antigènes. Cette observation suggère qu'une cellule - par exemple tumorale - ayant un contenu élevé en DPP3 est moins immunogène <sup>138</sup>.

### *Principaux substrats d'intérêt biologique*

Les principaux substrats d'intérêt en physiologie humaine sont présentés dans le **tableau 1**. Il faut noter que la quasi-totalité de ces substrats ont été identifiés dans des expériences menées *ex-vivo*. La capacité de DPP3 à cliver ses substrats *ex vivo* ne constitue pas une preuve définitive de l'implication de DPP3 dans le métabolisme de ces peptides *in vivo*. DPP3 clive des peptides de la famille des angiotensines et notamment dégrade l'angiotensine II en angiotensine IV (3-8) <sup>131</sup>. L'angiotensine IV est ensuite clivée en un térapeptide (5-8) sans activité biologique identifiée. DPP3 dégrade également l'angiotensine III (2-8), l'angiotensine (1-7) et l'angiotensine (1-5) <sup>110,131,139</sup>. Deux travaux suggèrent que DPP3 est effectivement impliqué dans le métabolisme des angiotensines *in vivo* :

Pang *et al.*, ont démontré dans un modèle d'hypertension murine induite par l'administration chronique d'angiotensine II, que l'injection de DPP3 recombinant était associée à une baisse de la pression artérielle ainsi qu'à une diminution de la concentration d'angiotensine II circulante <sup>140</sup>. En revanche, aucun effet sur la pression artérielle n'était observé lorsque l'hypertension était induite par la noradrénaline <sup>140</sup>.

Sha *et al.*, ont étudié une lignée de souris *Dpp3 knock out*. En comparaison avec le sérum issu des compagnons de portée *wild type*, le sérum des souris mâles *knock out* générait *ex vivo* des concentrations d'angiotensine I, II, III, IV et (1-5) plus importantes <sup>139</sup>. La pression artérielle de ces souris n'était pas altérée <sup>139</sup>.

DPP3 clive également avec une haute affinité des opioïdes endogènes telles que les enképhalines, les endomorphines, la dynorphine A (1-8) et la  $\beta$ -casomorphine <sup>141</sup>.

Substrat	Séquence et site(s) de clivage	Références
<b>Angiotensines</b>		
Angiotensine II (1-8)	Asp-Arg↓Val-Tyr↓Ile-His-Pro-Phe	139,140
Angiotensine III (2-8)	Arg-Val↓Tyr-Ile-His-Pro-Phe	142
Angiotensine IV (3-8)	Val-Tyr↓Ile-His-Pro-Phe	140
Angiotensine (1-7)	Asp-Arg↓Val-Tyr↓Ile-His-Pro	139
Angiotensine (1-5)	Asp-Arg↓Val-Tyr-Ile	139
<b>Enképhalines</b>		
Met-enképhaline	Tyr-Gly↓Gly-Phe-Met	127
Leu-enképhaline	Tyr-Gly↓Gly-Phe-Leu	141
<b>Endomorphines</b>		
Endomorphine-1	Tyr-Pro↓Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	141
Endomorphine-2	Tyr-Pro↓Phe-Phe-NH <sub>2</sub>	141
β-casomorphine	Tyr-Pro↓Phe-Val-Glu-Pro-Ile	141
Dynorphine A (1-8)	Tyr-Gly↓Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile	141

**Tableau 1. Principaux substrats de DPP3 d'intérêt en physiologie humaine.**

La flèche (↓) indique le(s) site(s) de clivage identifié(s).

Il faut mentionner également la capacité de DPP3 à cliver des substrats synthétiques et notamment des dérivés naphthylamides, permettant la mesure *in vitro* de l'activité DPP3. Le plus utilisé est le Arg-Arg-β-naphthylamide<sup>121</sup>. L'hydrolyse du dipeptide Arg-Arg permet la libération du β-naphthylamide, fluorescent (excitation à 340 nm, émission à 410 nm).

### 3.5 Rôle non enzymatique : Implication dans la réponse anti-oxydante

DPP3 intracellulaire est impliquée dans la régulation de la réponse anti-oxydante de manière indépendante de son activité enzymatique. En effet, il a été démontré que DPP3 est un régulateur de la voie NRF2/*Antioxydant response element* (ARE)<sup>143,144</sup>.

A l'état basal, NRF2 est produit en petite quantité et se lie rapidement à KEAP1. Cette liaison promeut l'ubiquitinylation de NRF2 et sa dégradation par le protéasome<sup>144</sup>.

L'interaction de KEAP1 et NRF2 est sujette à compétition ou à interférence par d'autres protéines contenant le motif Glu-Thr-Gly-Glu, incluant notamment les protéines p62/SQSTM1, PALB2, IKKB, PGAM5 et DPP3<sup>132</sup>. En se liant à KEAP1 via le motif Glu-Thr-Gly-Glu, ces protéines

réduisent le pool de KEAP1 disponible pour lier NRF2 et protègent ainsi NRF2 de la dégradation. Il a été démontré que l'interaction de DPP3 et KEAP1 était favorisée par le stress oxydatif et notamment la présence d'espèces réactives dérivées de l'oxygène <sup>132</sup>.

NRF2 ainsi protégé de la dégradation est ensuite transloqué dans le noyau où il agit comme facteur de transcription en se liant aux séquences *ARE* dans le promoteur des gènes cibles. Les gènes cibles de NRF2 sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans l'élimination des espèces dérivées de l'oxygène ainsi que le métabolisme ou la disposition des xénobiotiques (**tableau 2**). A titre d'exemples, il a été démontré le rôle de variation d'expression de DPP3 intracellulaire dans la résistance des cellules cancéreuses ainsi que dans la genèse de l'ostéoporose <sup>132,145</sup>

Gène	Références
<b>Défenses anti-oxydantes</b>	
NAD(P)H quinone deshydrogenase 1 ( <i>NQO1</i> )	146
Hème oxygénase 1 ( <i>HO1</i> )	146
Superoxide dismutase 3 ( <i>SOD3</i> )	146
Glucose-6-phosphate deshydrogenase ( <i>G6PD</i> )	146
Gluthation peroxidase 2 ( <i>GPX2</i> )	146
Chaîne légère de la ferritine	146
Peroxiredoxine 1 ( <i>PRX1</i> )	146
<b>Métabolisme et disposition des xénobiotiques</b>	
<i>MRP2,3,4</i>	147
UDP-glucuronosyltransferases	148
<b>Autres</b>	
<i>ETS1</i>	149

**Tableau 2. Principaux gènes régulés positivement par NRF2.**

### 3.6 Dipeptidyl peptidase 3 circulante en situation pathologique

#### *Rôle pronostique de la concentration de dipeptidyl peptidase 3 circulante chez le patient critique.*

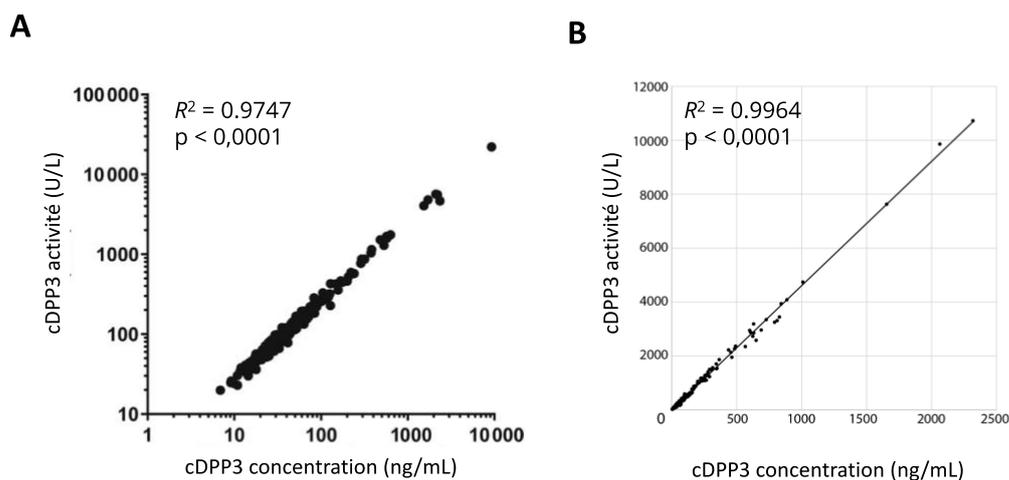
Plusieurs travaux de notre équipe se sont intéressés à la mesure de DPP3 plasmatique, aussi appelée DPP3 circulante (cDPP3). Dans une analyse *post-hoc* des données de l'essai OPTIMA-CC incluant des patients en état de choc cardiogénique, la concentration de cDPP3 à l'inclusion était associée au développement d'un état de choc réfractaire défini comme une élévation de la lactatémie associée à une détérioration des fonctions d'organe malgré l'utilisation de noradrénaline/adrénaline (>1 µg/kg/min) ou de dobutamine (>10 µg/kg/min) ou d'un ballon de contre-pulsion intra-aortique (Aire sous la courbe ROC : 0,73 [0,55-0,93])<sup>150</sup>. Dans ce travail, les patients ayant une concentration de cDPP3 supérieure au 3<sup>e</sup> quartile avaient un débit cardiaque et une estimation du DFG significativement plus faibles comparés au reste de la cohorte. Enfin, la baisse de la concentration de cDPP3 à 24h était associée à une réduction significative du risque de choc cardiogénique réfractaire ou de décès<sup>150</sup>. L'association avec le pronostic de l'état de choc cardiogénique a été confirmée au sein de la cohorte Cardshock<sup>151</sup>. Dans ce second travail, l'association<sup>152</sup> de cDPP3 avec la mortalité à J30 était confirmée (*Hazard ratio* [HR] standardisé : 1,4 [1,1-1,8]). Là encore, une réduction du taux de cDPP3 à 24h était associée à un pronostic moins défavorable.

La valeur pronostique de la concentration de cDPP3 a également été évaluée au cours des états septiques graves. Ainsi la concentration de cDPP3 est plus fréquemment élevée au cours du choc septique que du sepsis<sup>121,152</sup>. Dans cette situation, la concentration de cDPP3 à l'admission est associée à la mortalité à 28 jours (HR standardisé non ajusté 1,8 [CI 1,6-2,1]; HR ajusté 1.5 [CI 1.3-1.8]). De plus, une concentration élevée en cDPP3 était associée au recours ainsi qu'à la durée du support vasopresseur, à la ventilation mécanique ainsi qu'à l'épuration extra-rénale. Là encore, l'évolution de la concentration en cDPP3 était associée au pronostic. Chez les patients ayant une concentration initialement élevée, une diminution de la concentration à 24h sous le seuil de 40,4 ng/mL était associée à un pronostic comparable à celui des patients chez qui cDPP3 était constamment bas. Au contraire, la persistance d'une concentration de cDPP3 élevée était associée à une majoration des défaillances d'organe et au pronostic le plus défavorable<sup>152</sup>.

Enfin, la concentration de cDPP3 a été mesurée chez des patients souffrant de brûlures étendues. Chez ces patients, une concentration élevée en cDPP3 à l'admission était associée au développement d'une insuffisance circulatoire ou d'une insuffisance rénale aiguë dans les 48 premières heures de prise en charge, ainsi qu'au décès dans les 90 premiers jours, y compris après ajustement sur la surface corporelle brûlée <sup>153</sup>.

*Implication potentielle de cDPP3 dans la physiopathologie de l'insuffisance circulatoire.*

De manière intéressante, une corrélation parfaite a été observée entre la concentration et l'activité cDPP3 (**Figure 6**) <sup>121,151</sup>. Cette observation suggère, d'une part que DPP3 est relarguée sous sa forme active, d'autre part qu'il n'existe pas d'inhibiteur endogène ou exogène présent en quantité suffisante dans le plasma du patient critique pour inhiber de manière significative l'activité de l'enzyme. Par ailleurs, l'absence d'expression membranaire démontrée chez l'Homme autorise à interpréter l'activité circulante comme le reflet total de l'activité de DPP3 vis-à-vis des substrats circulants. Cette observation permet de formuler l'hypothèse d'un rôle physiopathologique de cDPP3 chez le patient critique. Ainsi cDPP3 par son activité de clivage de substrats ayant des propriétés cardiovasculaires pourrait participer à la genèse et à l'entretien de l'insuffisance circulatoire.



**Figure 6. Corrélation entre la concentration et l'activité circulante de DPP3.**

(A) Cohorte associant des volontaires sains et des patients atteints de sepsis/choc septique, d'après <sup>121</sup>. (B) Cohorte de patients atteints de choc cardiogénique, d'après <sup>151</sup>. DPP3 : Dipeptidyl peptidase 3.

Cette hypothèse est supportée par des travaux expérimentaux préliminaires. Chez la souris, l'injection de DPP3 humain purifié provoque une diminution transitoire de la fonction contractile ventriculaire gauche, mise en évidence par une baisse de la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche échographique <sup>151</sup>. A l'inverse, la dysfonction cardiaque catécholaminergique induite par l'injection répétée d'isoprénaline chez la souris est caractérisée par une baisse de la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche et des taux élevés de cDPP3. Dans ce modèle, l'administration d'un anticorps monoclonal inhibant l'activité cDPP3, le procizumab, est associée à une normalisation rapide de la fonction ventriculaire gauche <sup>151</sup>. Enfin, dans un modèle murin de cardiomyopathie septique, l'administration de l'anticorps monoclonal ciblant cDPP3 est associée à une amélioration de la fonction contractile ventriculaire gauche ainsi que du débit cardiaque <sup>154</sup>.

Ces travaux apportent la preuve de concept qu'une activité cDPP3 circulante élevée est susceptible d'aggraver ou d'entretenir la dysfonction circulatoire et que son ciblage représente une piste thérapeutique potentielle. En revanche les mécanismes précis liant l'activité cDPP3 et la fonction circulatoire restent inconnus. Parmi les substrats identifiés de DPP3, les enképhalines ou les angiotensines sont susceptibles d'être impliquées.

Les enképhalines sont des opioïdes endogènes impliqués notamment dans la modulation de la douleur et la réponse comportementale au stress <sup>155</sup>. Elle se lie aux récepteurs opioïdes  $\mu$  avec une affinité similaire à celle de la morphine et aux récepteurs  $\delta$  avec une affinité dix fois supérieure à celle de la morphine <sup>156</sup>. Des effets cardiovasculaires complexes directs ou indirects ont été décrits.

Ainsi, la leu-enképhaline administrée par voie systémique entraîne une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, un effet bloqué par la naloxone (antagoniste pan-opioïde) ou le propranolol (antagoniste  $\beta$ -adrénergique), suggérant que les effets observés sont dépendants de la stimulation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques <sup>157</sup>. Chez le rat, l'administration d'un agoniste synthétique des récepteurs opioïdes  $\delta$  est associée à une augmentation de la contractilité ventriculaire gauche et du débit cardiaque alors que la pression artérielle baisse <sup>158</sup>. Ces effets sont bloqués par le propranolol. De manière intéressante, il a été démontré l'existence de cellules chromaffines intra-cardiaques exprimant les récepteurs opioïdes  $\delta$  <sup>159</sup>. Après stimulation par un agoniste  $\delta$ -opioïde synthétique, ces

cellules sécrètent de l'adrénaline <sup>159</sup>. Ces données suggèrent que les effets cardiovasculaires des enképhalines seraient médiés par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques via le relargage de catécholamines. Néanmoins des données contradictoires ont été publiées. Ainsi l'administration de leu-enképhaline ou de met-enképhaline à forte dose au lapin est associée à une diminution de la pression artérielle et du rythme cardiaque <sup>160</sup>. Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer ces observations en apparence contradictoires : les différences dans le choix du modèle expérimental (espèce), les modalités d'anesthésie, la nature et la dose de l'agoniste des récepteurs opioïdes  $\delta$  employé. On peut supposer qu'à plus forte dose, la stimulation du nerf vague via les récepteurs opioïdes  $\mu$  serait responsable des effets dépresseurs <sup>161</sup>. A l'inverse, la stimulation isolée des récepteurs opioïdes  $\delta$  pourrait avoir un effet vagolytique <sup>162,163</sup>. Sur le plan rénal, ni les enképhalines ni les autres opioïdes ne semblent être associés à un effet hémodynamique direct <sup>164-167</sup>.

En conclusion, si les données disponibles suggèrent un rôle potentiel des opioïdes endogènes dans la modulation de la fonction cardiovasculaire, plus de données sont nécessaires pour en identifier les mécanismes et déterminer si ces effets sont pertinents en physiopathologie.

Les peptides du système rénine-angiotensine ont en revanche des effets cardiovasculaires bien établis.

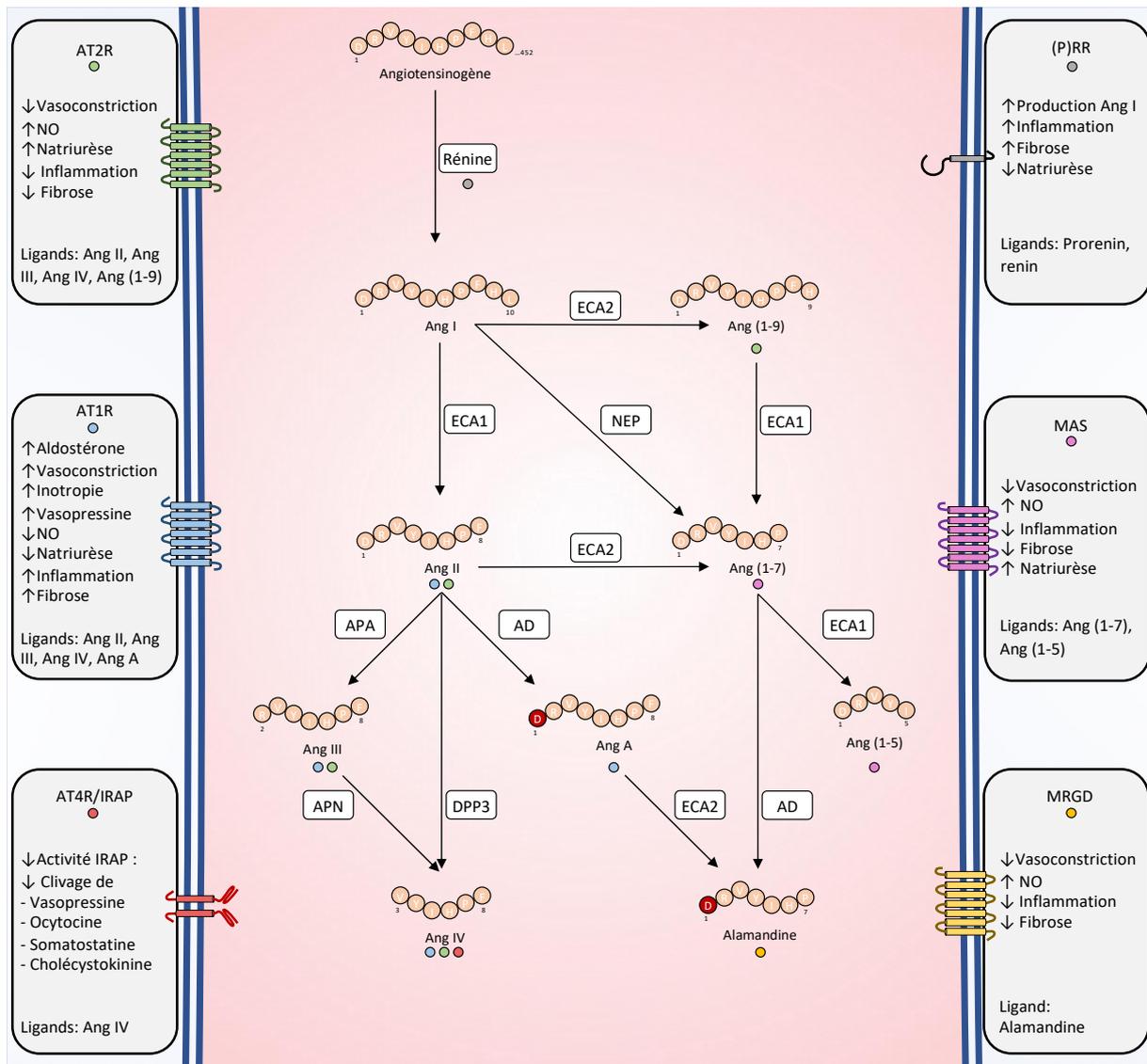
## 4. Le système rénine-angiotensine-aldostérone

### 4.1 Description du système rénine-angiotensine-aldostérone

Le SRAA est un ensemble complexe de plus de 30 enzymes, peptides et récepteurs (**figure 7**). La formation de tous les peptides effecteurs du SRAA dérive du clivage protéolytique séquentiel de l'angiotensinogène, aussi appelé cascade protéolytique.

L'angiotensinogène est une  $\alpha$ -glycoprotéine produite par les hépatocytes, et clivée par la rénine pour former le décapeptide inactif angiotensine I. La rénine est une enzyme produite par les cellules juxta-glomérulaires du rein et sécrétée via deux voies : une voie constitutive à l'origine de la sécrétion d'une forme inactive, appelée pro-rénine ; et une voie régulée à l'origine de la sécrétion pulsatile ou quanta-like de rénine active, sous l'influence de stimulus multiples. Parmi les plus importants de ces stimulus, la baisse de la pression de perfusion rénale, un apport insuffisant en sel ou la stimulation sympathique (**figure 8**)<sup>168</sup>. Cette régulation fine de la sécrétion de rénine est effective en quelques minutes et permet un ajustement précis de l'entrée dans le système et *in fine* des effets d'aval. Une induction plus lente de la synthèse et de la sécrétion d'angiotensinogène par plusieurs facteurs de stress tels que les glucocorticoïdes, les cytokines (Interleukine-1 et -6, interféron- $\gamma$ , *Tumor necrosis factor*  $\alpha$ ), œstrogènes, triiodothyronine et l'angiotensine II (rétrocontrôle positif) permet de maintenir une quantité suffisante de substrat pendant les situations de stress prolongé<sup>169</sup>.

A ce jour, il n'existe pas de preuve que la pro-rénine circulante puisse être convertie en rénine. Néanmoins cet aspect reste peu étudié<sup>170</sup>. En revanche, la liaison de la pro-rénine à un récepteur membranaire, appelé (*pro*-)renin receptor (PRR) entraîne l'activation non protéolytique de la pro-rénine et permet la génération locale d'angiotensine I<sup>170</sup>.



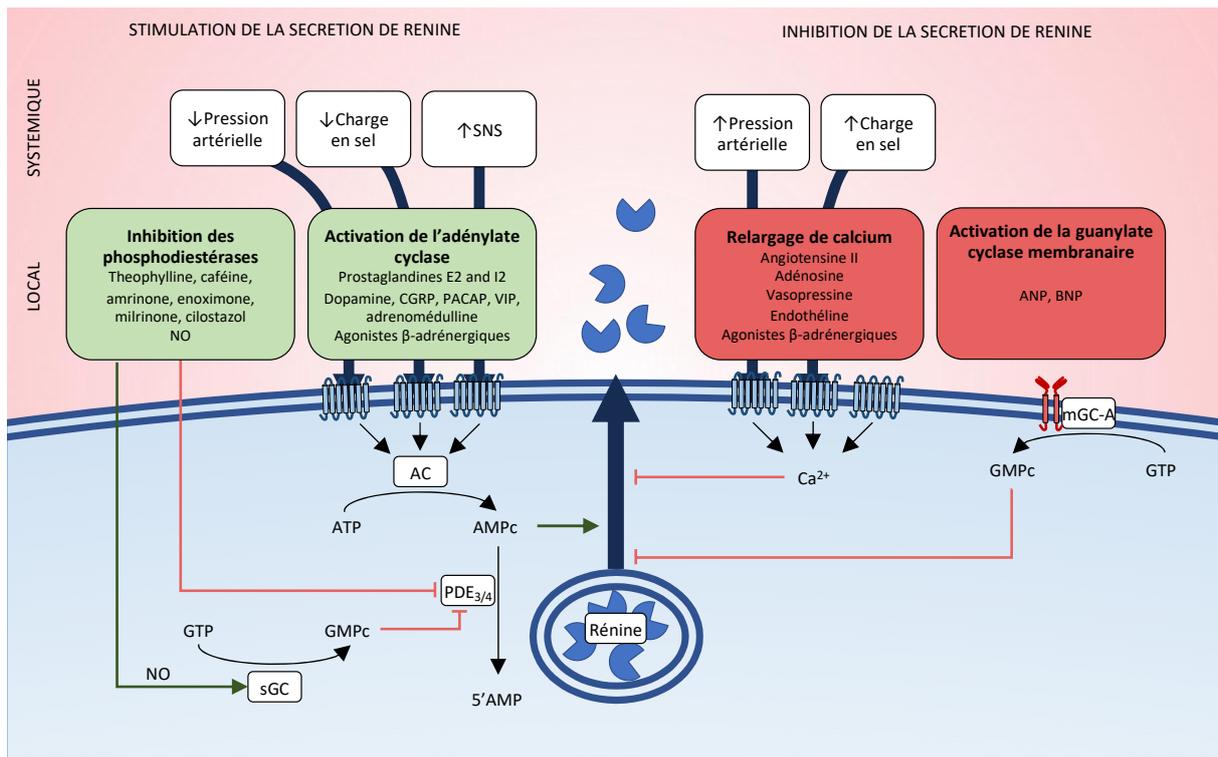
**Figure 7. Système rénine-angiotensine-aldostérone.**

Par souci de clarté, seules les réactions enzymatiques aboutissant à un substrat d'intérêt physiologique identifié sont représentées. Les interactions d'un ligand sont illustrées par le(s) cercle(s) de la couleur du(des) récepteur(s) correspondant(s) : bleu (AT1R), vert (AT2R), rouge (AT4R/IRAP), gris (PRR), violet (MAS) ou jaune (MGRD). Ang : Angiotensines, NO : Monoxyde d'azote, AT1R : Récepteur à l'angiotensine II de type 1, AT2R : Récepteur à l'angiotensine II de type 2. AT4R : Récepteur à l'angiotensine IV. IRAP : *Insulin-regulated aminopeptidase*, (P)RR : *(Pro-)renin receptor*. MRGD : *MAS-related G-protein-coupled receptor D*.

L'angiotensine I est ensuite clivée en C-terminal par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA1) pour former le principal effecteur du SRAA : l'octapeptide angiotensine II. L'ECA1 existe sous deux formes : une forme membranaire, principalement exprimée par les cellules endothéliales pulmonaires et une forme soluble ou circulante. Il est important de noter que la littérature supporte un rôle majoritaire de l'ECA1 membranaire, quantitativement plus importante, dans l'activité ECA1 totale <sup>171</sup>. L'angiotensine II agit via le récepteur de

l'angiotensine II de type 1 (AT1R), médiant ses effets vasoconstricteurs, prolifératifs, pro-fibrotiques et pro-inflammatoires ainsi que la libération d'aldostérone par la surrénale. Bien que cela n'ait pas été formellement démontré chez l'homme, la stimulation d'AT1R exerce également un effet inotrope positif, démontré *in vitro* ainsi que chez l'animal <sup>172,173</sup>. En outre,, la stimulation d'AT1R à la surface des cellules juxta-glomérulaires exerce un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion de rénine <sup>168</sup>. Un autre récepteur, appelé récepteur à l'angiotensine II de type 2 (AT2R) semble médier des effets opposés à AT1R <sup>174</sup>. L'angiotensine II est clivée en Angiotensine III (2-8) par l'aminopeptidase A puis en angiotensine IV (3-8) par l'aminopeptidase N. Alternativement, l'angiotensine II peut être clivée directement en angiotensine IV par DPP3. L'angiotensine III stimule AT1R et AT2R avec une affinité similaire à l'angiotensine II et ainsi produit des effets systémiques comparables bien que sa clairance soit plus rapide <sup>175,176</sup>. L'angiotensine IV lie également les récepteurs de l'angiotensine II avec une faible affinité et possède également un récepteur spécifique doté d'une activité enzymatique appelé récepteur de l'angiotensine IV (AT4R) ou *Insulin Regulated AminoPeptidase* (IRAP). La liaison de l'angiotensine IV inhibe l'activité d'IRAP et prolonge ainsi la demi-vie de ses substrats comme l'ocytocine ou la vasopressine <sup>177-179</sup>.

En parallèle du SRAA « classique » précédemment décrit, un système dit « alternatif » a plus récemment été mis en évidence. L'entrée dans ce système peut se faire à plusieurs niveaux. Un homologue de l'ECA1, appelée enzyme de conversion de type 2 (ECA2) catalyse la formation d'angiotensine (1-9) à partir d'angiotensine I et d'angiotensine (1-7) à partir d'angiotensine II. Additionnellement, l'angiotensine (1-7) peut être produite par des prolyl peptidases à partir de l'angiotensine II, ou directement par la néprilysine ou endopeptidase neutre (NEP) directement à partir de l'angiotensine I. La contribution respective de ces différentes enzymes reste mal connue. L'ECA1 catalyse ensuite la formation d'angiotensine (1-7) à partir d'angiotensine (1-9) puis d'angiotensine (1-5) à partir de (1-7). Les deux effecteurs principaux de ce système alternatif, l'angiotensine (1-7) et l'angiotensine (1-5) médient leurs effets vasodilatateurs, anti-inflammatoires, anti-fibrosant et natriurétiques via leur récepteur MAS <sup>180</sup>.



**Figure 8. Régulation de la sécrétion de rénine.**

Les cellules juxtaglomérulaires sécrètent la rénine par exocytose en réponse à de nombreux stimulus. Les facteurs systémiques tels que la pression artérielle, l'apport en sel et l'activation du système nerveux sympathique exercent leurs effets directement ou indirectement par l'intermédiaires de médiateurs locaux. Au niveau cellulaire, tous les médiateurs stimulant la sécrétion de rénine agissent par l'intermédiaire d'une accumulation d'AMPc. A l'inverse, tous les stimulus associés à l'accumulation de calcium intracellulaire inhibent la sécrétion de rénine. Le GMPC favorise ou inhibe la sécrétion de rénine, en fonction de son mode de production. L'activation de la guanylate cyclase soluble par le NO inhibe la PDE3 et ainsi stimule la sécrétion de rénine. A l'inverse, l'activation de la guanylate cyclase membranaire par les peptides natriurétiques inhibe la sécrétion de rénine. SNS: système nerveux sympathique, NO: monoxyde d'azote, AC: adénylate cyclase, mGC-A: guanylate cyclase A membranaire, sGC: guanylate cyclase soluble, PDE3/4: Phosphodiésterase 3/4, ATP: adénosine triphosphate, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, GTP: Guanosine triphosphate, GMPC: guanosine monophosphate cyclique.

#### 4.2 Le système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'insuffisance circulatoire

*Le système rénine-angiotensine est un système compensateur lors des situations de stress*

Il existe une certaine dichotomie entre situation physiologique et pathologique au regard de la dépendance au SRAA. Ainsi, en conditions purement physiologiques et notamment lorsque l'apport en sodium est suffisant et que les autres systèmes de maintien de la pression artérielle sont intègres, le SRAA ne semble pas indispensable au maintien de l'hémodynamique. Dans ces conditions, l'administration d'un antagoniste de la rénine ou de

AT1R n'entraîne pas de modification hémodynamique notable <sup>181,182</sup>. L'administration d'un IEC en revanche, s'accompagne d'une baisse de la pression artérielle puisque l'enzyme de conversion catalyse également la dégradation de la bradykinine, un peptide vasodilatateur <sup>182,183</sup>. En revanche, le SRAA joue un rôle clef dans les situations de stress en permettant le maintien de l'hémodynamique principalement via l'action vasoconstrictrice et anti-natriurétique de l'angiotensine II et la sécrétion d'aldostérone par la surrénale, permettant de potentialiser la réabsorption de sodium. Ainsi, une déplétion sodée préalable démasque l'hypotension lors de l'administration d'un antagoniste de AT1R chez l'homme <sup>184</sup>. Les patients sous inhibiteurs du SRAA sont plus susceptibles de présenter une hypotension lors de l'induction d'une anesthésie générale <sup>185</sup>. Dans ce contexte spécifique, il a été élégamment démontré que les principaux systèmes de régulation de la pression artérielle, à savoir le système sympathique, le système vasopressinergique et le SRAA, sont étroitement interconnectés et capables d'une compensation mutuelle. Cependant, lorsque les trois systèmes sont compromis, une hypotension potentiellement mortelle survient <sup>186</sup>. L'interconnexion étroite entre ces trois systèmes est encore soulignée par l'évidence d'une synergie entre eux. A titre d'exemple, la vasoconstriction provoquée par l'angiotensine II est potentialisée par la noradrénaline ou la vasopressine <sup>187,188</sup>.

Les effets à court terme du SRAA sur la fonction rénale dépendent à la fois de la modulation de la pression de perfusion rénale, mais aussi d'une action différentielle sur les deux pôles glomérulaires. L'angiotensine II exerce un effet vasoconstricteur préférentiel sur l'artériole glomérulaire efférente. En conséquence, la perte de cet effet vasoconstricteur tend donc à faire baisser la  $P_{CG}$  et donc le DFG <sup>189</sup>. Chez l'animal ou l'humain sain, ces modifications hémodynamiques n'entraînent pas directement de modifications fonctionnelles <sup>190,191</sup>. En revanche, en situation de stress, la prise d'un inhibiteur du SRAA précipite la réduction du DFG <sup>189</sup>.

Les modèles animaux d'insuffisance circulatoire démontrent de manière convaincante le rôle de l'intégrité du SRAA dans le maintien de l'hémodynamique systémique ou rénale. Ainsi, une néphrectomie ou l'administration d'un inhibiteur de l'ECA1 aggravent l'hypotension artérielle au cours du choc hypovolémique ou endotoxique expérimental <sup>192,193</sup>. Dans les modèles animaux de choc septique, l'administration d'un antagoniste de AT1R aggrave

l'insuffisance rénale tandis que l'administration d'angiotensine II est associée à une amélioration de la fonction rénale <sup>87,88</sup>.

### *Perturbation du SRAA au cours de l'insuffisance circulatoire distributive*

Les données disponibles suggèrent des dysfonctions du SRAA au cours de l'état de choc distributif et notamment du choc septique. Chez les patients critiques, une concentration élevée de rénine a été associée à une pression artérielle plus basse, une incidence plus importantes d'évènements rénaux ainsi qu'à une mortalité plus importante <sup>194-196</sup>. Au cours de l'insuffisance circulatoire distributive, une concentration de rénine élevée est observée, corrélée à une élévation de la concentration d'angiotensine I circulante <sup>195</sup>. Néanmoins cette activation d'amont du SRAA contraste avec des concentrations d'angiotensine II en règle normale voir basses <sup>195,197</sup>, et donc d'un ratio angiotensine I / angiotensine II élevé, associé à une mortalité plus importante <sup>197</sup>. Toutes choses égales par ailleurs, le ratio angiotensine I / angiotensine II est inversement corrélé à l'activité de ECA1 <sup>183</sup>. En conséquence, l'observation d'un ratio élevé chez les patients souffrant d'insuffisance circulatoire distributive a conduit à attribuer les altérations observées à un défaut d'activité ECA1 en premier lieu <sup>195,197</sup>. En effet, un tel défaut d'activité ECA1 a été mis en évidence chez les patients présentant des lésions pulmonaires aiguës associées au sepsis, en cohérence avec l'expression dominante de l'enzyme, suggérant un rôle clef de l'endothéliopathie (pulmonaire) associée au sepsis <sup>198-200</sup>. Alternativement, le défaut d'activité ECA1 pourrait être lié à la présence d'inhibiteurs circulants <sup>201,202</sup>. Pour note, puisque l'ECA1 catalyse également la dégradation de la bradykynine, un tel défaut d'activité est susceptible de mener à une accumulation de ce peptide vasodilatateur, aggravant l'insuffisance circulatoire <sup>183</sup>.

Néanmoins, plusieurs mécanismes intriqués pourraient expliquer les perturbations du SRAA au cours du choc septique (**figure 9**). Ainsi, une dégradation accrue de l'angiotensine II et/ou un défaut d'expression membranaire du récepteur AT1R pourraient s'ajouter au défaut de génération de l'angiotensine II pour *in fine* aboutir à un défaut de signalisation.

Des travaux anciens ont ainsi démontré l'augmentation progressive de l'activité angiotensinase du plasma au cours du choc endotoxique chez le chien <sup>29</sup>. Parmi les enzymes participant théoriquement à cette activité de clivage de l'angiotensine II, seules quelques-unes ont été étudiées dans le contexte spécifique de l'insuffisance circulatoire. Comme évoqué

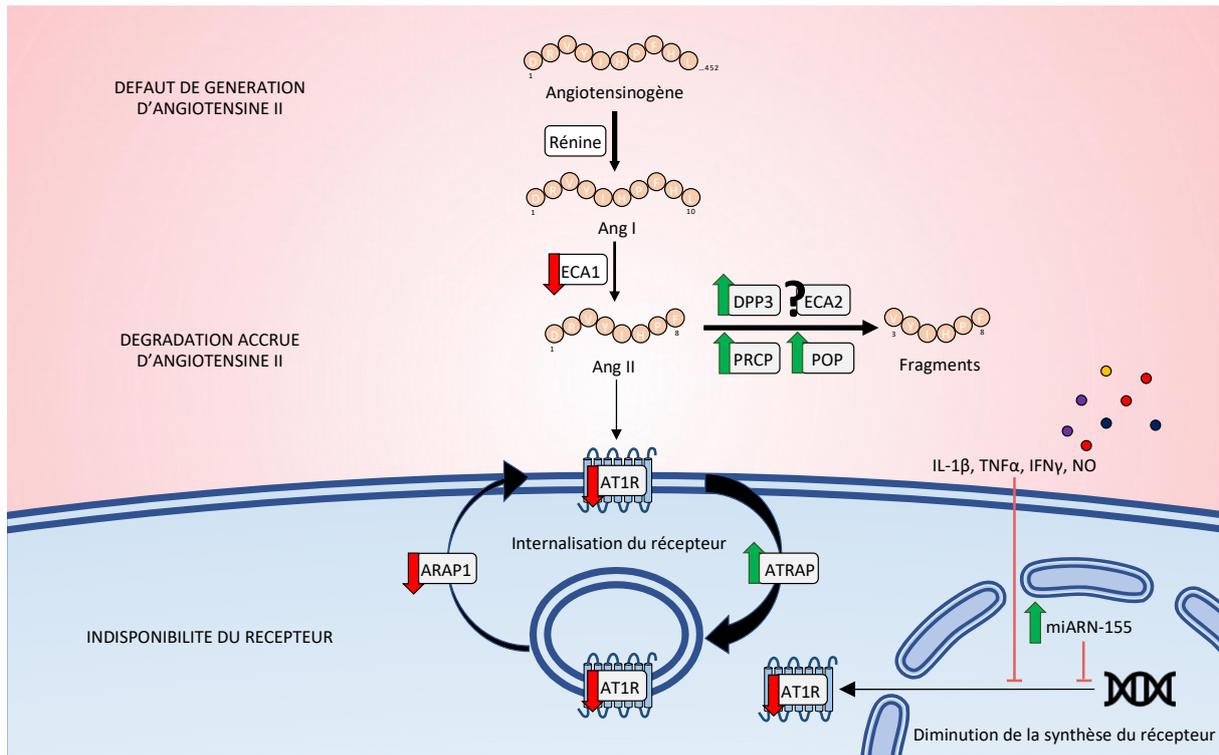
précédemment, la concentration de cDPP3 est augmentée chez certains patients atteints de choc septique<sup>152</sup>. De manière intéressante, DPP3 clive l'angiotensine II en angiotensine IV, puis l'angiotensine IV en un peptide inactif. En revanche, DPP3 ne clive pas l'angiotensine I, de sorte qu'une augmentation de l'activité cDPP3, toutes choses égales par ailleurs, peut théoriquement mener à une augmentation du ratio angiotensine I / angiotensine II. Parmi les autres enzymes clivant l'angiotensine II, l'ECA2 n'a pas été spécifiquement étudiée dans le contexte de l'insuffisance circulatoire humaine ou expérimentale. D'autres enzymes pourraient être impliquées telles la prolyl oligopeptidase ou la prolyl carboxypeptidase mais la magnitude d'augmentation de leur activité circulante paraît faible en comparaison avec DPP3<sup>203</sup>. Enfin, la NEP clive l'angiotensine II et peut théoriquement court-circuiter ECA1 en générant de l'angiotensine (1-7) à partir d'angiotensine I. Bien que la concentration circulante de NEP soit augmentée chez le patient critique, cette augmentation n'est pas associée au pronostic, potentiellement parce qu'au cours du sepsis concentration et activité NEP sont dissociées au cours du choc septique, vraisemblablement en raison de la présence d'inhibiteurs circulants<sup>204,205</sup>.

Enfin, la sensibilité réduite à l'angiotensine II au cours du choc septique humain et expérimental suggère un défaut en aval de l'angiotensine II. Ce défaut de signalisation pourrait résulter d'un défaut d'expression membranaire du récepteur AT1R, en rapport avec une internalisation ou une réduction de sa synthèse. La localisation membranaire du récepteur est en effet modulée par deux protéines : l'*AT1R-associated protein* (ATRAP), favorisant l'internalisation du récepteur ; et l'*AT1R-associated protein 1* (ARAP1), favorisant le recyclage du récepteur à la membrane<sup>206,207</sup>. De manière intéressante, un polymorphisme génétique de *ATRAP* a été associé avec une expression accrue de la protéine *in vitro*, ainsi qu'avec une vasoplégie accrue chez les patients, mise en évidence par une pression artérielle plus basse au cours du sepsis ou en post-opératoire de chirurgie cardiaque et une surmortalité<sup>208</sup>. A l'inverse, l'expression de ARAP1 est régulée à la baisse au cours de l'endotoxémie expérimentale ou après exposition *in vitro* à des cytokines pro-inflammatoires<sup>209</sup>. Une pression artérielle plus basse chez la souris *Arap1* KO après injection d'endotoxine suggère que l'absence d'ARAP1 participe au développement de l'hypotension via la réduction de la sensibilité à l'angiotensine II<sup>209</sup>. De plus, le monoxyde d'azote et les cytokines pro-inflammatoires régulent négativement la transcription du gène AT1R<sup>210,211</sup>. Le micro-ARN-155, surexprimé au cours du sepsis humain et expérimental pourrait également réguler

négativement la transcription d'AT1R, entraînant une diminution de la sensibilité à l'angiotensine II <sup>212</sup>.

De manière notable, la prescription croissante des inhibiteurs du SRAA expose les patients atteints d'insuffisance circulatoire à des causes iatrogènes de signalisation insuffisante. Par exemple, la prise d'un inhibiteur de la rénine ou d'un inhibiteur de ECA1 pourrait être à l'origine d'un défaut de production d'angiotensine II. Alternativement, la prise d'un antagoniste de AT1R ou sartan réduit la sensibilité à l'angiotensine II. Il est important de noter que certains de ces médicaments ont une demie-vie longue et une élimination rénale préférentielle, exposant les patients à des perturbations prolongées du système.

Les altérations listées ci-dessus sont susceptibles d'advenir isolément ou de s'associer pour provoquer, *in fine*, un découplage entre l'activation du système (mesurée par la sécrétion de rénine), et les effets d'aval (stimulation de AT1R). De manière intrigante, l'évidence d'un tel découplage pourrait être retrouvée dans les situations d'hypoaldostéronisme hyperréninémique décrites précédemment chez un sous-groupe de patients critiques <sup>213-215</sup>. Ces patients, en dépit d'une activité rénine circulante constamment augmentée, présentaient une aldostérone normale ou même diminuée. Notamment, ce profil était plus fréquemment retrouvé chez des patients en choc septique et était associée à une plus grande incidence d'insuffisance rénale aiguë et à une moindre survie <sup>213-215</sup>.



**Figure 9. Perturbations du système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'état de choc distributif.**

Les perturbations du système rénine-angiotensine-aldostérone sont susceptible de survenir à trois niveaux, de manière non mutuellement exclusive : 1. Défaut de génération d'angiotensine II, par exemple en rapport avec un déficit d'activité ECA1. 2. Dégradation accrue de l'angiotensine II, par exemple en rapport avec une augmentation de l'activité de DPP3 circulante. 3. Indisponibilité du récepteur, en raison d'une internalisation sous l'effet de protéines adaptatrice ou d'une diminution de la synthèse du récepteur en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, au NO, ou au micro-ARN-155. ECA1 : Enzyme de conversion de l'angiotensine, ECA2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2, DPP3 : Dipeptidyl peptidase 3, PRCP : Prolyl carboxypeptidase, POP : Prolyl oligopeptidase. AT1R : Récepteur à l'angiotensine II de type 1, ATRAP : *AT1R-associated protein*, ARAP1 : *AT1R-associated protein 1*. IL-1 $\beta$  : Interleukine-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$ , IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$ , NO : Monoxyde d'azote.

#### *Administration d'angiotensine II au cours du choc distributif*

Dans les modèles animaux de choc septique, un support vasopresseur par angiotensine II permet d'atteindre les objectifs de réanimation hémodynamique de manière similaire à la noradrénaline<sup>216,217</sup>. Chez l'Homme, l'utilisation d'angiotensine II d'origine bovine était initialement limitée à des situations de sauvetage, chez le patient en état de choc réfractaire<sup>218,219</sup>. Le développement d'une angiotensine II humaine synthétique a permis son évaluation à plus grande échelle. L'essai randomisé contrôlé ATHOS-3 a évalué l'adjonction d'angiotensine

II ou d'un placebo chez des patients atteints de choc distributif réfractaire aux catécholamines<sup>68</sup>. Le critère de jugement principal, la réponse en termes de pression artérielle moyenne à 3 heures du début de l'infusion, définie comme l'obtention d'une pression artérielle moyenne supérieure à 75 mmHg ou un incrément d'au moins 10 mmHg sans augmentation du débit de perfusion des autres vasopresseurs, était atteint plus fréquemment par les patients randomisés dans le bras angiotensine II, en comparaison avec les patients ayant reçu le placebo (69,9% vs 23,4%,  $p < 0,001$ ). Il n'y avait pas de différence significative sur les critères de jugements secondaires tels que le changement moyen du score SOFA à 48h de l'inclusion ou la mortalité à J7 ou J28. Une analyse post-hoc a suggéré que chez les patients nécessitant une épuration extra-rénale aiguë à l'inclusion, le délai de libération de l'épuration était significativement plus court et la survie significativement plus importante chez les patients randomisés dans le bras angiotensine II comparativement au placebo<sup>220</sup>. En dépit de ces résultats intéressants et biologiquement plausibles, la nature *post-hoc* de l'analyse et l'absence de critères pré-définis pour l'initiation et le sevrage de l'épuration extra-rénale prévient toute conclusion définitive. De plus, parmi les patients ayant une concentration de rénine supérieure à la médiane de la population d'ATHOS-3, la randomisation dans le bras angiotensine II était associée avec une réduction significative de la mortalité à J28, en comparaison au placebo (50,9% vs 69,9%,  $p = 0,012$ ), suggérant le potentiel de la rénine comme un biomarqueur d'enrichissement potentiel dans des essais futurs. Il reste néanmoins à démontrer prospectivement que l'angiotensine II améliore le pronostic des patients souffrant d'insuffisance circulatoire. En outre, plusieurs points devront être éclaircis :

Premièrement, il est incertain que l'angiotensine II doive être administrée à tous les patients présentant une insuffisance circulatoire distributive. De manière notable, la réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine II n'est pas constante au cours du choc vasoplégique. En effet, 30% randomisés dans le bras angiotensine II d'ATHOS-3 n'ont pas présenté de réponse en pression artérielle à 3h en dépit de l'utilisation de doses élevées (jusqu'à 200 ng/kg/min)<sup>68</sup>. A l'inverse, un phénomène de réponse exacerbée a été décrit<sup>221-223</sup>. Cette diversité dans le profil de réponse pourrait refléter la diversité des mécanismes de perturbations du SRAA précédemment décrits. Selon cette hypothèse, les patients ayant un défaut isolé de génération de l'angiotensine II seraient susceptibles de présenter une réponse exacerbée à l'administration de doses pharmacologiques d'angiotensine II exogène. A l'inverse, de fortes doses pourraient ne pas être suffisantes chez un patient présentant une dégradation accrue

de l'angiotensine II et/ou une indisponibilité du récepteur AT1R. Chez ces patients, des stratégies alternatives ou complémentaires pourraient être nécessaires. L'utilisation de biomarqueurs prédictifs pourrait éventuellement aider à caractériser le phénotype des altérations du SRAA en cause et aider à personnaliser les thérapeutiques.

Deuxièmement, dans ATHOS-3, 80,7% des patients avaient un choc septique. Il reste à déterminer si l'angiotensine II est bénéfique au cours de l'insuffisance circulatoire distributive non septique. Les mécanismes moléculaires à l'origine des altérations du SRAA ont été principalement décrits dans des contextes septiques, et la balance bénéfico-risque dans des situations non septiques telles qu'une pancréatite sévère, des brûlures étendues ou en post-opératoire de chirurgie cardiaque peut différer. Les patients ayant récemment subi une agression cardiaque représentent une population à risque et des études spécifiques sont nécessaires pour évaluer la pertinence et la sécurité du traitement par l'angiotensine II dans ces cas.

Troisièmement, dans ATHOS-3, plus de deux tiers des patients recevaient au moins deux vasopresseurs avant le début de l'infusion d'angiotensine II ou de son placebo, majoritairement l'association noradrénaline et vasopressine. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'angiotensine II devrait être administrée en première ligne ou en tant que 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> médicament vasopresseur. Alternativement, le bénéfice d'une stratégie balance primaire associant d'emblée noradrénaline, vasopressine et angiotensine II pourrait être évalué <sup>224</sup>.

Finalement, le profil des effets indésirables demande à être précisé. Bien que les taux d'évènements d'intérêt spécifique dans ATHOS-3 ne différaient pas significativement selon le bras de randomisation, une incidence cumulée d'évènements thrombotiques artériels et/ou veineux était observée chez les patients ayant reçu de l'angiotensine II <sup>68,225</sup>. Cette observation est cohérente avec les propriétés pro-thrombotiques de l'angiotensine II et a motivé la recommandation d'administrer une prophylaxie anti-thrombotique aux patients traités <sup>226</sup>.

En conclusion, les données actuelles suggèrent l'existence de perturbations multifactorielles du SRAA au cours de l'insuffisance circulatoire distributive et notamment au cours du choc septique. Les conséquences principales de ces perturbations sont l'aggravation de l'hypotension artérielle et l'installation d'une insuffisance rénale aiguë. Pour l'heure, la stratégie thérapeutique envisagée se limite à l'administration d'angiotensine II mais le bénéfice

du médicament demande encore à être démontré de façon formelle. Si le rôle potentiel de cDPP3 dans les altérations du SRAA était confirmé, une stratégie visant à inhiber son activité pourrait être envisagée en tant que thérapeutique alternative ou complémentaire à l'administration d'angiotensine II.

## Hypothèse et objectifs

Nous avons fait l'hypothèse d'un rôle pathologique de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire, via son activité de clivage de peptides bioactifs et notamment des angiotensines. Selon cette hypothèse, une augmentation importante de la concentration de cDPP3 serait responsable d'une aggravation de la défaillance hémodynamique et d'un pronostic défavorable.

Les objectifs de cette thèse étaient :

- Sur le plan clinique, de consolider les données acquises sur la valeur pronostique de cDPP3 initial et de sa cinétique chez le patient critique, en particulier au cours de l'insuffisance circulatoire.
- Sur le plan expérimental, d'explorer les mécanismes physiopathologiques liant cDPP3 à la genèse et ou l'entretien de l'insuffisance circulatoire.

La stratégie utilisée pour pouvoir répondre à ces objectifs reposait sur :

- L'analyse de cohortes de patients critiques : d'une part une large population de patients admis en réanimation toutes causes confondues : la cohorte FROG-ICU <sup>227</sup>. D'autre part, l'analyse ancillaire des données d'un essai randomisé consacré au choc cardiogénique - l'essai ACCOST-HH <sup>228</sup>.
- L'investigation des effets hémodynamiques médiés par DPP3, via la modulation de l'activité cDPP3 à l'aide de l'injection de DPP3 humain purifié ou de l'administration d'un anticorps humanisé ciblant cDPP3, le procizumab, chez la souris.

Plusieurs travaux sont développés :

- Partie I : Rôle pronostique de la mesure de la concentration de dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire.
  1. *High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective, and observational FROG-ICU cohort*, publié dans le *British Journal of Anaesthesia*.

2. *High circulating dipeptidyl peptidase 3 predicts mortality and the need for organ support in cardiogenic shock: An ancillary analysis of the ACCOST-HH trial*, soumis à l'*European Heart Journal*.
- Partie II : Rôle physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 au cours de l'insuffisance circulatoire.
  3. *Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3*, publié dans l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
  4. *Circulating dipeptidyl peptidase 3 modulates systemic and renal hemodynamics through angiotensins cleavage*, en révision pour *Hypertension*.
  5. *Marked interplay between circulating dipeptidyl peptidase 3 and the renin-angiotensin system*, soumis à l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.

Deux autres travaux réalisés au cours de la thèse sont présentés en annexe :

- Annexe 1. *The renin-angiotensin-aldosterone system in septic shock*, revue « prête à soumettre » sur les altérations du SRAA au cours du choc septique, reprenant - entre autres - certains des éléments développés au chapitre 4 de l'introduction.
- Annexe 2. *The CLIP-based mortality score in cardiogenic shock: suitable only for cardiogenic shock?*, correspondance publiée dans l'*European Journal of Heart failure*.

## Partie I. Rôle pronostique de la mesure de la concentration de dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire.

### 1. Rôle pronostique de la concentration de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire : Résultats issus de la cohorte FROG-ICU.

#### 1.1 Introduction

Les données précédemment acquises ont souligné l'existence d'une concentration accrue de cDPP3 au cours de l'état de choc cardiogénique, du choc septique et de l'insuffisance circulatoire associée aux brûlures étendues <sup>150-153</sup>. Dans ces situations, l'élévation de la concentration de cDPP3 est associée à un pronostic défavorable. En revanche, il reste incertain que cette élévation soit spécifique de situations d'insuffisance circulatoire et ne puisse être retrouvée dans d'autres situations pathologiques menant à l'admission en soins critiques. Par ailleurs, la valeur pronostique de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire de cause et de mécanisme différent tel que le choc hypovolémique, en particulier hémorragique reste inexplorée.

Pour explorer ces questions, nous avons utilisé la cohorte prospective multicentrique *French and euROpean Outcome reGistry in Intensive Care Units* (FROG-ICU). Brièvement, l'étude FROG-ICU visait à évaluer le devenir à long terme des patients admis en soins intensifs ainsi qu'à identifier les facteurs de risque de morbi-mortalité. Tous les patients consécutifs de 21 réanimations médicales, chirurgicales ou mixtes en France et en Belgique admis entre août 2011 et juin 2013 ont été inclus s'ils nécessitaient une ventilation mécanique invasive et/ou un traitement vasopresseur/inotrope pendant plus de 24 heures après leur admission. Les patients ont été suivis jusqu'à leur décès ou jusqu'à 1 an après leur sortie des soins intensifs. Les données et la biobanque de la cohorte FROG-ICU ont été utilisées pour évaluer l'association entre la concentration de cDPP3 et le pronostic des patients. La concentration de cDPP3 a été mesurée sur les échantillons disponibles, prélevés à l'inclusion dans l'étude et au moment de la sortie de soins intensifs. La concentration a été mesurée par immunoluminescence comme précédemment décrit <sup>121</sup>.

Notre hypothèse était d'une part que les patients en situation d'insuffisance circulatoire présentaient des concentrations de cDPP3 supérieures en comparaison avec les autres patients critiques, d'autre part que cette concentration était associée au pronostic à court terme de l'insuffisance circulatoire quelle qu'en soit la cause sous-jacente.

## High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort

Benjamin Deniau<sup>1,2,3,4</sup>, Adrien Picod<sup>1,2</sup>, Dirk Van Lier<sup>5</sup>, Prabakar Vaittinada Ayar<sup>2,6</sup>, Karine Santos<sup>7</sup>, Oliver Hartmann<sup>8</sup>, Etienne Gayat<sup>1,2,3,4</sup>, Alexandre Mebazaa<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Alice Blet<sup>1,2,4,†</sup> and Ferial Azibani<sup>2,4,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals Saint-Louis - Lariboisière, AP-HP, Paris, France, <sup>2</sup>UMR-S 942, INSERM, MASCOT, Paris University, Paris, France, <sup>3</sup>Université de Paris, Paris, France, <sup>4</sup>FHU PROMICE, AP-HP, Paris, France, <sup>5</sup>Department of Intensive Care Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases (RCI), Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands, <sup>6</sup>Emergency Department, University Hospital of Beaujon, AP-HP, Clichy, France, <sup>7</sup>TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany and <sup>8</sup>Sphingotec GmbH, Hennigsdorf, Germany

\*Corresponding author. E-mail: alexandre.mebazaa@aphp.fr

†Contributed equally as senior author.

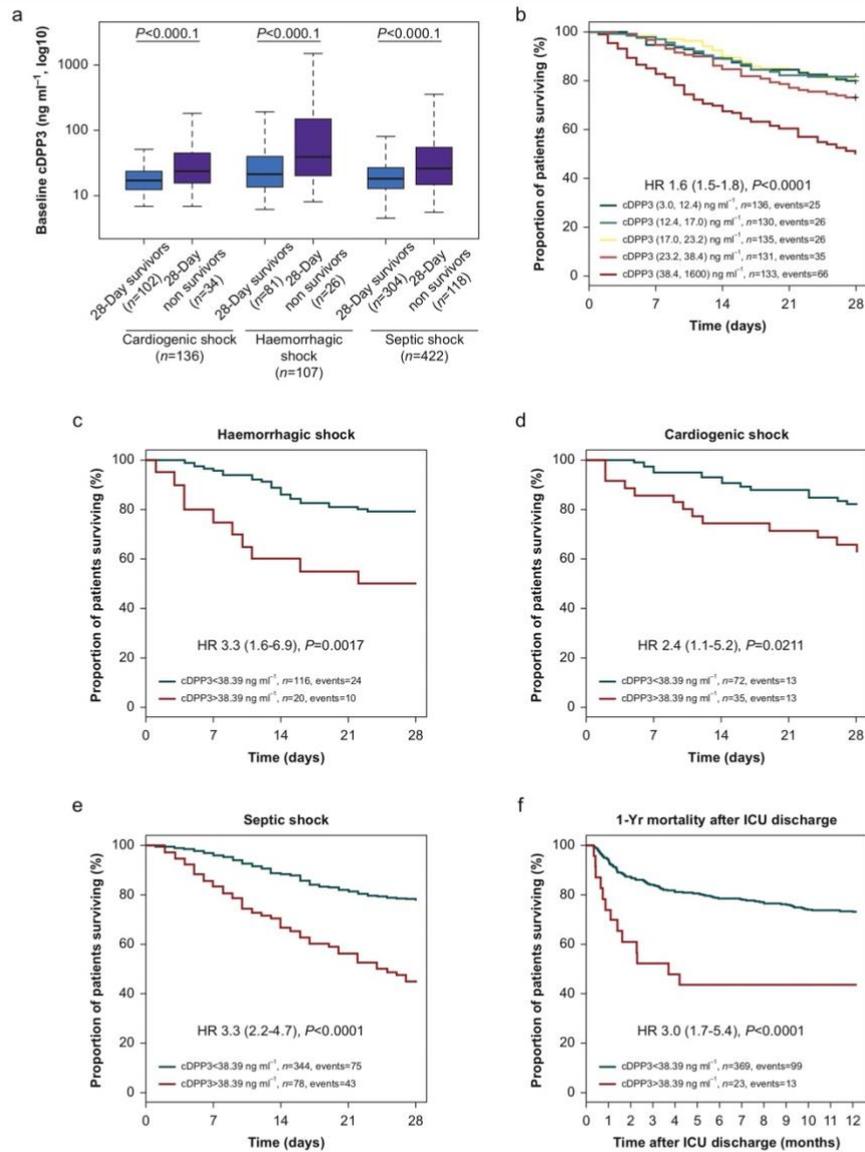
**Keywords:** biomarker; dipeptidyl peptidase 3; mortality; outcome; sepsis; shock

---

Editor—Shock is a common condition associated with high morbidity and mortality in the ICU.<sup>1</sup> Rapid and accurate stratification of the patient in shock could improve referral to an appropriate care centre, management, and prognosis. Few biomarkers have proved their value in the stratification of shocked patients. Circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) is a metallo-peptidase involved in the metabolism of cardiovascular peptides.<sup>2</sup> Recent studies demonstrated the ability of cDPP3 to predict poor outcomes in septic or cardiogenic shock.<sup>3,4</sup> However, the prognostic properties of cDPP3 in haemorrhagic shock remain unknown. Thus, the aim of the present study was to assess the ability of cDPP3 to

predict outcome in septic, cardiogenic, and haemorrhagic shock in a substudy of the FROG-ICU study.

This study is an ancillary analysis of the FROG-ICU study (NCT01367093) which has been described.<sup>5</sup> The purpose of this study was to assess the incidence of mortality in the year after ICU discharge. Patients were enrolled from August 2011 to June 2013. Haemorrhagic shock was defined as a hypovolaemic shock requiring catecholamines secondary to severe blood loss.<sup>6</sup> Septic shock was defined according to the Third International Consensus definition for sepsis and septic shock.<sup>7</sup> Cardiogenic shock was defined as cardiac impairment that results in reduced systolic BP (SBP) <90 mm Hg or inotrope use



**Fig 1.** (a) Baseline cDPP3 levels in ICU according to the type of shock in 28-day survivors (white) and non-survivors (grey) (comparison between 28-day survivors and non-survivors using Wilcoxon test). (b) Kaplan–Meier curve representing 28-day survival of patients hospitalised for shock ( $n=665$ ) according to baseline cDPP3 levels in ICU. Kaplan–Meier curves representing 28-day survival of patients admitted to ICU for (c) haemorrhagic shock ( $n=107$ ), (d) cardiogenic shock ( $n=136$ ), and (e) septic shock ( $n=422$ ), according to baseline cDPP3 levels. (f) Kaplan–Meier curve representing the 1-yr survival after ICU discharge of shocked patients according to cDPP3 levels at ICU discharge. Comparison performed with the log-rank test. cDPP3, circulating dipeptidyl peptidase 3; HR, hazard ratio.

to maintain SBP >90 mm Hg.<sup>8</sup> Clinical and biological data were recorded daily during the first week after enrolment, and then twice a week during ICU stay until discharge. Blood samples were processed and stored at -80°C before blinded DPP3 measurements in plasma (DPP3-luminometric immunoassay, coefficient variation <10%). The primary endpoint was 28-day mortality. Secondary endpoints were occurrence of acute kidney injury (AKI) during ICU stay and 1-yr mortality after ICU discharge. Values are expressed as median and inter-quartile range or count and percentage, as appropriate. Cox proportional-hazard regression was used to assess the association between cDPP3 levels and survival. Kaplan–Meier plots were used for illustration of survival endpoints. All statistical tests were two-tailed and a two-sided P-value of 0.05 was considered significant.

Of 2087 patients enrolled, 665 were admitted for shock: 422 (64%) for septic shock, 136 (20%) for cardiogenic shock, and 107 (16%) for haemorrhagic shock. In shocked patients, 28-day mortality was 27% (n=178), and 1-yr mortality was 47% (n=317). Baseline median cDPP3 was 20.1 (13.6–32.1) ng ml<sup>-1</sup>. Baseline median cDPP3 in non-shocked patients was lower (17.5 [12.5–26.4] ng ml<sup>-1</sup>, P<0.001) compared with shocked patients. Median cDPP3 at baseline was higher in 28-day non-survivors compared with survivors (27.0 [15.7–56.5] ng ml<sup>-1</sup> vs 18.5 [12.9–26.7] ng ml<sup>-1</sup>, P<0.001) and for each type of shock (Fig. 1a). Cox regression analysis showed an association between cDPP3 levels and 28-day mortality (Fig. 1b) (hazard ratio [HR] 1.6 [1.5–1.8], P<0.0001). Overall, baseline cDPP3 levels were predictive of 28-day mortality (C-index of cDPP3 0.64 [0.59–0.69], P<0.00001). By comparison, C-index for lactate, N-terminal-pro brain natriuretic peptide and troponin I at baseline to predict 28-day mortality were 0.64 (0.59–0.69), 0.65 (0.61–0.69), and 0.64 (0.60–0.68), respectively (P<0.00001). The C-index for age, Glasgow Coma Score, Simplified Acute Physiology Score (SAPS), and Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score at baseline to predict 28-day mortality were 0.60 (0.55–0.64), 0.60 (0.54–0.65), 0.66 (0.62–0.69), and 0.66 (0.61–0.71), respectively (P<0.00001). cDPP3 level provided added predictive value to each of the above variables (all P≤0.00001 for added value according to nested regression models).

We observed that elevated cDPP3 levels measured at baseline were associated with 28-day mortality for haemorrhagic shock patients (C-index 0.67 [0.55–0.79]), followed by cardiogenic and septic shock (C-index 0.63 [0.53–0.74] and 0.63 [0.57–0.69], P<0.001, respectively). Patients admitted with cDPP3 levels above the highest quintile (e.g. 38.9 ng ml<sup>-1</sup>, upper limit of normal is 40 ng ml<sup>-1</sup>) have an increased risk of death at 28 days (HR 3.3 [1.6–6.9], P=0.0017 for cardiogenic shock, HR 2.4 [1.1–5.2], P=0.0211 for haemorrhagic shock, and HR 3.3 [2.2–4.7], P<0.0001 for septic shock) (Fig. 1c–e). At ICU discharge, patients who died during the following year had higher cDPP3 levels than patients who survived (17.7 [13.5–26.3] vs 15.9 [11.8–21.6] ng ml<sup>-1</sup>, P=0.0061). The weak prognosis in the year after ICU discharge in patients with high cDPP3 levels (>38.9 ng ml<sup>-1</sup>) at discharge was confirmed by a C-index of 0.59 [0.53–0.64], P<0.0001. ICU survivors with high cDPP3 levels remained at high risk of death in the year after discharge (HR 3.0 [1.7–5.4], P=0.0001) (Fig. 1f). Of patients admitted to the ICU for shock, 427 (64.2%) developed AKI during the ICU stay, and 225 (33.8%) patients required renal replacement therapy (RRT). Levels of cDPP3 at baseline were higher in patients who developed AKI when compared with those who did not

(22.7 [14.6–9.6] ng ml<sup>-1</sup> vs 16.5 [11.7–23.2] ng ml<sup>-1</sup>, P<0.001). At last, we observed that patients requiring RRT had higher cDPP3 levels at baseline when compared with those who did not require RRT (23.2 [14.7–41.2] ng ml<sup>-1</sup> vs 18.7 [12.7–27.4] ng ml<sup>-1</sup>, P<0.0001).

Our study showed that cDPP3 levels were associated with mortality and occurrence of AKI in the major causes of shock. Previous studies have highlighted the association between cDPP3 levels and patient outcomes.<sup>3,4,9</sup> We confirm these findings in a larger cohort of shocked patients, and added evidence for haemorrhagic shock patients. These results suggest that cDPP3 levels may provide an important prognostic biomarker to help physicians improve and optimise the management of shocked patients in whom cDPP3 levels are high at admission. cDPP3 is a metalloproteinase mainly involved in the cleavage of cardiovascular peptides, notably angiotensin 2.<sup>2</sup> The link between cDPP3 levels and the occurrence of shock and organ failure is not clear. Clinical and experimental studies suggest a myocardial depressant effect of high circulating levels of DPP3.<sup>4</sup> Thus, inhibition of cDPP3 during shock could be an interesting therapeutic approach as demonstrated in a preclinical model of septic shock.<sup>10</sup> To conclude, in this ancillary analysis of the FROG ICU study, we showed an association between high cDPP3 levels, either at baseline or at discharge, and short- and long-term prognosis in patients admitted to the ICU for shock.

#### Authors' contributions

Contributed to study design, data analysis, figure preparation, and manuscript revision: all authors  
Conducted statistical analysis: OH  
Read and approved the manuscript: all authors

#### Acknowledgements

Authors are particularly grateful to Marie-Céline Fournier who coordinated organisational aspects of the study. They also thank the Centre de Recherche Clinique (CRC) of Lariboisière University Hospital for support and the investigators of the FROG-ICU study.

#### Declarations of interest

AM reports personal fees from Novartis, Orion, Roche, Servier, Sanofi, Otsuka, Philips, grants and personal fees from Adrenomed, Abbott, and grants from 4TEEN4. AM owns <€3000 shares of S-Form Pharma company. BD and AB were invited to a meeting in Henningsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. KS is employed at 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, which owns patent rights for the cDPP3 biomarker. OH is employed at Sphingotec GmbH, a company holding licence rights for cDPP3. The remaining authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research authorship, publication of this article, or both.

#### Funding

FROG ICU (ClinicalTrials.gov NCT01367093) was funded by the Programme National de la Recherche Clinique [AON 10-216] and by a research grant from the Société Française d'Anesthésie-Réanimation.

## References

1. Annane D, Ouane-Besbes L, de Backer D, et al. A global perspective on vasoactive agents in shock. *Intensive Care Med* 2018; **44**: 833–46
2. Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* 2011; **278**: 3256–76
3. Blet A, Deniau B, Santos K, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit Care Lond Engl* 2021; **25**: 61
4. Deniau B, Rehfeld L, Santos K, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. *Eur J Heart Fail* 2020; **22**: 290–9
5. Mebazaa A, Casadio MC, Azoulay E, et al. Post-ICU discharge and outcome: rationale and methods of the the French and euROpean Outcome reGistry in Intensive Care Units (FROG-ICU) observational study. *BMC Anesthesiol* 2015; **15**: 143
6. Cannon JW. Hemorrhagic shock. *N Engl J Med* 2018; **378**: 370–9
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 801–10
8. Arrigo Mattia, et al. Optimising clinical trials in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: a statement from the 2020 Critical Care Clinical Trialists Workshop. *Lancet Respiratory Medicine* 2021: 1192–202. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00172-7)
9. Frigyesi A, Lengquist M, Spångfors M, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 on intensive care unit admission is a predictor of organ dysfunction and mortality. *J Intensive Care* 2021; **9**: 52
10. Deniau B, Blet A, Santos K, 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**: e0238039

doi: 10.1016/j.bja.2021.11.021

Advance Access Publication Date: 8 December 2021

© 2021 Published by Elsevier Ltd on behalf of British Journal of Anaesthesia.

### 1.3 Discussion

Dans ce travail analysant les données d'une grande cohorte de patients admis en soins intensifs, nous avons montré que les patients en situation d'insuffisance circulatoire présentaient des concentrations de cDPP3 significativement plus élevées que le reste de la population critique. L'association entre une concentration de cDPP3 élevée et une mortalité accrue à court terme au cours du choc cardiogénique ou septique a été confirmée. De plus, une association pronostique similaire a été retrouvée pour les patients admis pour un état de choc hémorragique.

Ainsi, la valeur pronostique d'une concentration élevée de cDPP3 est conservée, et la taille de l'effet relativement similaire, quelle que soit la cause initiale de l'insuffisance circulatoire. De manière intéressante, un surrisque de mortalité est observée essentiellement pour les patients ayant des valeurs de cDPP3 au-dessus du 4<sup>e</sup> quintile de la cohorte, soit 38,9 ng/mL. Cette valeur est très proche du seuil de 40 ng/mL, correspondant au 97,5<sup>e</sup> percentile d'une population ambulatoire et considéré comme la limite supérieure des valeurs fréquemment observées au sein d'une population ambulatoire (données non publiées, issues de la cohorte *Malmö Preventive Project*).

La population de choc cardiogénique incluse dans FROG-ICU peut sembler particulière, en particulier du fait d'une mortalité à court terme sensiblement inférieure à celle rapportée dans la littérature<sup>229,230</sup>. Les raisons de cette disparité sont peu claires mais une hypothèse en particulier peut être évoquée : la grande majorité des données de la littérature se focalisent sur l'état de choc cardiogénique post-infarctus du myocarde. Il est possible que les causes sous-jacentes d'état de choc cardiogénique dans la population de FROG-ICU diffèrent sensiblement. Néanmoins cette donnée n'a pas été recueillie de manière standardisée et n'était donc pas analysable.

Cette étude présente plusieurs limites. Tout d'abord il s'agit d'une analyse secondaire d'une cohorte élaborée pour investiguer le devenir à long terme. Ainsi, peu de données étaient disponibles pour analyser plus précisément le phénotype de l'insuffisance circulatoire et notamment pour déterminer si l'élévation de cDPP3 s'associe à des caractéristiques

communes malgré une cause initiale différente. Les données expérimentales suggérant une implication de cDPP3 dans la modulation du tonus vasculaire et/ou de la fonction cardiaque, il aurait pu être intéressant de rechercher une association entre la concentration de cDPP3 et la sévérité de la vasoplégie et/ou la présence d'une dysfonction myocardique.

Par ailleurs, nos analyses étaient concentrées sur les 3 causes les plus fréquentes d'insuffisance circulatoire et il n'a pas été possible d'étudier la concentration de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire de cause plus rare telle que le choc anaphylactique ou l'état de choc hypovolémique non hémorragique.

En conclusion, cette analyse secondaire de FROG-ICU démontre l'association entre la concentration de cDPP3 à l'inclusion et la mortalité à court terme, après admission pour un état de choc cardiogénique, septique ou hémorragique.

## 2. Association entre la concentration de cDPP3, le recours aux supports d'organe et la mortalité au cours de l'état de choc cardiogénique : Une étude ancillaire de l'essai ACCOST-HH.

### 2.1 Introduction

La baisse du débit cardiaque, mécanisme physiopathologique central aboutissant à l'état de choc cardiogénique peut résulter de plusieurs causes. L'infarctus du myocarde est, historiquement, la cause la plus fréquente de choc cardiogénique <sup>231</sup>. Dans ce contexte, l'état de choc est directement secondaire à la perte de fonction contractile de la zone infarctée et/ou à une complication mécanique : rupture de paroi libre, rupture septale avec constitution d'une communication inter-ventriculaire ou rupture de pilier mitral <sup>232,233</sup>.

Néanmoins, des causes non ischémiques sont de plus en plus souvent reconnues comme étant responsable d'un état de choc cardiogénique. Ces causes cumulées pourraient actuellement être responsables de plus de la moitié des admissions pour choc cardiogénique et incluent : l'insuffisance cardiaque chronique décompensée, les valvulopathies, les arythmies ventriculaires ou supra-ventriculaires sévères, les myocardites, les cardiomyopathies septiques ou toxiques etc. <sup>231,234,235</sup>.

Cette population de chocs cardiogéniques non ischémiques est hétérogène et peu étudiée. Outre un traitement étiologique différent, il est incertain que les patients ayant un état de choc cardiogénique de cause non-ischémique répondent de la même manière au traitement symptomatique, incluant traitements vasopresseurs et inotropes ou assistance circulatoire mécanique transitoire.

A ce jour, les deux études ayant évalué la valeur pronostique de cDPP3 spécifiquement au cours du choc cardiogénique ont inclus quasi-exclusivement des patients souffrant de choc cardiogénique post-infarctus du myocarde <sup>150,151</sup>. Le travail précédent, issu de la cohorte FROG-ICU ne permet pas de connaître avec précision la cause sous-jacente du choc cardiogénique, cette donnée n'ayant pas été colligée de manière standardisée <sup>236</sup>. La valeur pronostique de ce biomarqueur au cours du choc cardiogénique de cause non-ischémique reste donc incertaine. Par ailleurs, l'utilisation de techniques d'assistance circulatoire mécanique temporaires modernes (à l'exclusion du ballon de contre-pulsion intra-aortique) reste marginale dans ces

études : 7% dans l'étude de Takagi *et al.*, incluant des patients de l'essai OPTIMA-CC mené entre 2011 et 2016 <sup>49</sup>, 5% dans l'étude de Deniau *et al.*, incluant des patients de la cohorte Cardshock recrutés entre 2010 et 2012 <sup>237</sup>.

Ainsi, l'objectif de l'étude présente était d'évaluer l'association entre une concentration élevée de cDPP3 et le pronostic dans une cohorte contemporaine de patients souffrant de choc cardiogénique de causes diverses.

## European Heart Journal

### High circulating dipeptidyl peptidase 3 predicts mortality and the need for organ support in cardiogenic shock: An ancillary analysis of the ACCOST-HH trial --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	High circulating dipeptidyl peptidase 3 predicts mortality and the need for organ support in cardiogenic shock: An ancillary analysis of the ACCOST-HH trial
<b>Article Type:</b>	Clinical Research
<b>Keywords:</b>	Cardiogenic shock, dipeptidyl peptidase 3, circulatory failure
<b>Corresponding Author:</b>	Adrien PICOD, MD PhDc Hôpital Lariboisière: Hopital Lariboisiere Paris, FRANCE
<b>Order of Authors (with Contributor Roles):</b>	Adrien PICOD, MD PhDc Hugo Nordin Dominik Jarczak Tanja Zeller Claire Oddos Karine Santos Oliver Hartmann Antoine Herpain Alexandre Mebazaa Stefan Kluge Ferial Azibani Mahir Karakas
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Hôpital Lariboisière: Hopital Lariboisiere
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Adrien PICOD, MD PhDc
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Abstract</p> <p>Background: Cardiogenic shock is burdened with high mortality. Efforts to improve outcome are hampered by the difficulty of individual risk stratification and the lack of targetable pathways. Previous studies demonstrated that elevated circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) is an early predictor of short-term outcome in cardiogenic shock, mostly of ischemic origin. Whether cDPP3 is related to outcome in a more diverse population remains unknown.</p> <p>Methods: cDPP3 concentration was measured at baseline and after 72 hours in the ACCOST-HH trial. The association of cDPP3 with 30-day mortality and need for organ support was assessed.</p> <p>Findings: Median cDPP3 concentration at baseline was 43.2 ng/mL [21.2-74] and 77 out of the 150 patients (52%) had high cDPP3 concentrations over the pre-defined cutoff of 40 ng/mL. Elevated DPP3 was associated with higher 30-day mortality (adjusted (a) HR=1.7 [1.0-2.9]), longer need for cardiovascular organ support (3 [0-24])</p>

	<p>vs 21 days [5–26], <math>p &lt; 0.0001</math>), renal replacement therapy (56 vs 22%, <math>p &lt; 0.0001</math>) and mechanical ventilation (90 vs 74%, <math>p = 0.04</math>). Patients with sustained high cDPP3 had poor prognosis. Patients with initially high but decreasing cDPP3 at 72 hours had markedly reduced 30-day mortality (aHR=0.17 [0.084–0.34]), comparable to patients with sustained low cDPP3 (aHR=0.23 [0.12–0.41]). Need for organ support was markedly reduced in subpopulations with sustained low or decreasing cDPP3.</p> <p>Interpretation: The present study confirms the prognostic value of cDPP3 in a contemporary population of cardiogenic shock. The results hold strong promise for clinical trials evaluating the anti-DPP3-antibody as breakthrough therapy in cardiogenic shock.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Thomas Lüscher cardio@tomluescher.ch Expert in the field of acute coronary syndromes and cardiogenic shock</p> <p>Peter Pickkers Peter.pickkers@radboudumc.nl Expert in the field of circulatory failure</p> <p>Francisco Fernandez-Aviles faviles@secardiologia.es Expert in the field of cardiogenic shock</p> <p>Holger Thiele holger.thiele@medizin.uni-leipzig.de expert in the field of cardiogenic shock</p> <p>Susanna Price S.Price@rbht.nhs.uk Expert in the field of cardiogenic shock</p> <p>Adrian Banning Adrian.Banning@ouh.nhs.uk Expert in the field of cardiogenic shock</p> <p>Mark Petrie mark.petrie@glasgow.ac.uk Expert in the field of cardiogenic shock</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
Total Word Count:	3859
Word Count Manuscript-only (excluding references):	2000
As Corresponding Author, I take full responsibility for all information declared in this notification.	Yes
As Corresponding Author, I agree to be the principal correspondent with the Editorial Office, review the edited manuscript and proof, and make decisions about releasing manuscript information to the media, federal agencies, etc.	Yes
All persons who have made substantial contributions to the manuscript (e.g. data acquisition, analysis, or writing / editing	Yes

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

assistance), but who do not fulfill authorship criteria, are named with their specific contributions in the Acknowledgements Section of the manuscript.	
All persons named in the Acknowledgements Section have provided the Corresponding Author with written permission to be named in the manuscript.	Yes
If an Acknowledgements Section is not included in the paper then no other persons have made substantial contributions to this manuscript.	Yes
Please enter the names of the authors who did anything else on the manuscript other than what we have listed:	None
This manuscript represents valid and substantiated work.	Yes
If asked, I will provide or fully cooperate in obtaining and providing the original data on which the manuscript is based so the editors or their designates can examine it.	Yes
All named authors are aware of this submission and fulfil the four criteria for authorship as outlined in the <a href="#">ICMJE criteria</a>	Yes
<b>TWITTER</b> Please provide the Twitter handle of one or more authors (or their institutions) involved in this contribution. The social media team will use these when disseminating the work (if accepted).	@Adrien_Picod, @AlexMebazaa
<b>First Author Secondary Information:</b>	

## High circulating dipeptidyl peptidase 3 predicts mortality and the need for organ support in cardiogenic shock: An ancillary analysis of the ACCOST-HH trial

Adrien Picod<sup>1,\*</sup>, Hugo Nordin<sup>1,\*</sup>, Dominik Jarczak<sup>2</sup>, Tanja Zeller<sup>3,4,5</sup>, Claire Oddos<sup>1</sup>, Karine Santos<sup>6</sup>, Oliver Hartmann<sup>7</sup>, Antoine Herpain<sup>8,9</sup>, Alexandre Mebazaa<sup>1,10</sup>, Stefan Kluge<sup>2</sup>, Ferial Azibani<sup>1,£</sup>, Mahir Karakas<sup>2,5,6,£</sup>

\*,£: These authors contributed equally.

### Affiliations:

1. INSERM UMR-S 942 MASCOT - Paris – Cité University, Paris, France
2. Department of Intensive Care Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
3. University Center of Cardiovascular Science, University Heart and Vascular Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
4. Department of Cardiology, University Heart & Vascular Center Hamburg, Hamburg, Germany
5. German Centre for Cardiovascular Research, Partner Site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany
6. 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Hennigsdorf, Germany
7. SphingoTec GmbH, Hennigsdorf, Germany
8. Experimental Laboratory of Intensive Care, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
9. St. Pierre University Hospital, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
10. Department of Anesthesiology and Intensive Care, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France.

**Correspondence:**

Mahir Karakas, MD PhD MBA

1. Department of Intensive Care Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)176 45862749

Fax: +49 (0) 40 7410 - 57020

Mail: m.karakas@uke.de

**Keywords:** Cardiogenic shock, dipeptidyl peptidase 3, circulatory failure

**Abbreviations:**

CS: cardiogenic shock

AMI: Acute myocardial infarction

(c)DPP3: (circulating) dipeptidyl peptidase 3

MCS: Mechanical circulatory support

RRT: Renal replacement therapy

ECMO: Extracorporeal membrane oxygenation

## **Abstract**

*Background:* Cardiogenic shock is burdened with high mortality. Efforts to improve outcome are hampered by the difficulty of individual risk stratification and the lack of targetable pathways. Previous studies demonstrated that elevated circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) is an early predictor of short-term outcome in cardiogenic shock, mostly of ischemic origin. Whether cDPP3 is related to outcome in a more diverse population remains unknown.

*Methods:* cDPP3 concentration was measured at baseline and after 72 hours in the ACCOST-HH trial. The association of cDPP3 with 30-day mortality and need for organ support was assessed.

*Findings:* Median cDPP3 concentration at baseline was 43.2 ng/mL [21.2-74] and 77 out of the 150 patients (52%) had high cDPP3 concentrations over the pre-defined cutoff of 40 ng/mL. Elevated DPP3 was associated with higher 30-day mortality (adjusted (a) HR=1.7 [1.0-2.9]), longer need for cardiovascular organ support (3 [0–24] vs 21 days [5–26],  $p<0.0001$ ), renal replacement therapy (56 vs 22%,  $p<0.0001$ ) and mechanical ventilation (90 vs 74%,  $p=0.04$ ). Patients with sustained high cDPP3 had poor prognosis. Patients with initially high but decreasing cDPP3 at 72 hours had markedly reduced 30-day mortality (aHR=0.17 [0.084–0.34]), comparable to patients with sustained low cDPP3 (aHR=0.23 [0.12–0.41]). Need for organ support was markedly reduced in subpopulations with sustained low or decreasing cDPP3.

*Interpretation:* The present study confirms the prognostic value of cDPP3 in a contemporary population of cardiogenic shock. The results hold strong promise for clinical trials evaluating the anti-DPP3-antibody as breakthrough therapy in cardiogenic shock.

## **Introduction**

Cardiogenic shock (CS) can be defined as a state of persisting low cardiac output associated with insufficient organ perfusion. Acute myocardial infarction (AMI) is its most frequent cause although up to 50% of all CS might be related to other etiologies including acute decompensated heart failure, valvular abnormalities, severe arrhythmia, myocarditis, septic cardiomyopathy etc... (1,2). Despite contemporary management, CS is still burdened with high mortality (~30-50% in-hospital mortality) and efforts to improve outcome are hampered by the difficulty of individual risk stratification and the lack of targetable pathways (1).

The dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves the N-terminal extremity of various bioactive peptides, including angiotensins, enkephalins and endomorphins. The plasma concentration of DPP3, termed circulating DPP3 (cDPP3), is low in healthy subjects. An increase in cDPP3 concentration has been observed in critically ill patients with various causes of circulatory failure, including septic, hemorrhagic and cardiogenic shock as well as circulatory failure associated with extensive burns (3,4). Additionally, high cDPP3 is associated with subsequent cardiogenic shock and mortality in acute coronary syndromes (5). To date, two studies have evaluated the prognostic value of cDPP3 in cardiogenic shock and consistently found a negative impact of high cDPP3 concentration on survival (6,7). However, these studies almost exclusively included patients with CS secondary to acute myocardial infarction. Additionally, the use of mechanical circulatory support in these studies was scarce and may not reflect the current use of such strategies.

Importantly, preclinical studies in animal models of acute cardiac dysfunction and septic shock have suggested that cDPP3 could be targetable and demonstrated improved hemodynamics following the administration of an anti-DPP3 antibody (6,8).

Thus, the aims of the present study were to assess the association between high cDPP3 and outcomes in a population of cardiogenic shock due to different etiologies.

## **Methods**

### *Study design and population*

This study is an ancillary analysis of the AdreCizumab against plaCebO in Subjects with cardiogenic shock, (ACCOST-HH) trial (9,10). Briefly, ACCOST-HH was an investigator-initiated, prospective, double-blind, multicentre, randomized, placebo-controlled trial assessing the

efficacy and safety of the anti-adrenomedullin antibody enibarcimab (formerly adrecizumab, HAM8101) in CS secondary to AMI or other entities. The trial was conducted between April 5, 2019, and January 13, 2021, in four university hospitals in Germany and included 150 adult patients randomized to either enibarcimab or placebo within 48h of admission. Exclusion criteria were mainly resuscitation for longer than 60 min and CS due to sustained ventricular tachycardia or bradycardia. Patients were followed until death or up to 90 days after inclusion. Clinical and biological data were recorded at admission and during intensive care unit stay including the cause of cardiogenic shock as well as the use of life-sustaining therapies such as vasopressors/inotropes, mechanical circulatory support (MCS), renal replacement therapy (RRT), or invasive mechanical ventilation.

The objective of the present study was to assess the prognostic value of cDPP3 in the ACCOST-HH trial population by assessing the association with 30-day survival and the need for organ support.

#### *Sample collection and measurement*

As part of the trial protocol, blood samples for cDPP3 measurement were obtained before and at 72 h after randomization in tubes containing ethylene-diamine-tetra-acetic acid, immediately processed. Plasma samples were stored at -80 °C and subsequently used for blinded cDPP3 measurement using a luminescence immunoassay (4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Berlin, Germany) (11). For reference, using this technique, median cDPP3 in healthy subjects is 10 ng/mL [IQR 9-13 ng/mL] and the 97.5th percentile is 40 ng/mL (unpublished data).

#### *Statistical analysis*

Results were expressed as median [interquartile range (IQR)] or number (percentage) as appropriate. The predefined cDPP3 cutoff of 40 ng/mL, was used (12). Group comparisons for continuous variables were performed using the Kruskal–Wallis test. Categorical data were compared using Pearson's Chi-squared Test for Count Data. Biomarker data were log-transformed. Survival curves plotted by the Kaplan–Meier method were used for illustrative purposes. Association between cDPP3 and survival were estimated using Cox proportional hazard models with results presented as hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI)

before and after adjustment on age and sex. Subgroup analyses were performed according to the cause of shock (AMI or other entities) and the use of MCS at baseline (veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and/or Impella®).

All statistical analyses were conducted using R version 4.2.2 (<http://www.r-project.org>) and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). A two-sided p-value of 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *Study population*

Among 150 patients included in ACCOST-HH, 149 with available samples were included in the present analysis. Median cDPP3 at inclusion was 43.2 ng/mL [21.2-74.0] and 77 (52%) patients had cDPP3 over the predefined cutoff of 40.0 ng/mL. Patients' characteristics according to cDPP3 concentration ( $>$  or  $\leq$  40 ng/mL) are presented in table 1. Notably, cDPP3 at inclusion was higher in patients who required second line inotropes (levosimendan or milrinone) or mechanical circulatory support (ECMO and/or Impella®) at the time of sampling (**supplemental figure S1**).

### *Association between baseline cDPP3 and 30-day mortality.*

The overall mortality at day 30 was 40.0% and did not differ according to the cause of shock (**supplemental figure S2**). Although the concentration declined over time, median cDPP3 was significantly higher in non-survivors versus survivors at both inclusion (52.6 ng/mL [IQR 24.9 – 115.0] versus 36.9 ng/mL [IQR 20.5 – 68.0];  $p = 0.026$ ) and H72 (27.9 ng/mL [IQR 18.7 – 54.9] versus 17.50 ng/mL [IQR 12.6 – 25.2];  $p < 0.0001$ ) (**figure 1A**). High cDPP3 was associated with higher 30-day mortality (HR= 1.9 (95% CI= 1.1-3.1,  $p = 0.024$ ) (**figure 1B**). This association persisted after adjustment on age and sex (adjusted HR = 1.7 [1.0-2.9],  $p = 0.049$ ). Subgroup analyses suggested that this association was stronger in patients with other causes of CS than AMI and in patients who were not under MCS at the time of sampling (**figure 1C**). Of note, the effect of enibarcimab on 30-day mortality was similar in the low cDPP3 and the high cDPP3 subpopulation (**supplemental figure S3**)

*Association between baseline cDPP3 and the need for organ support.*

The median number of days alive without cardiovascular support was significantly lower in the high cDPP3 population compared to the low cDPP3 population (3 [IQR 0–24] versus 21 days [IQR 5–26],  $p < 0.0001$ ). Additionally, high cDPP3 was associated with higher need for renal replacement therapy (56 vs 22%,  $p < 0.0001$ ) and invasive mechanical ventilation within the first 30 days (90 vs 74%,  $p=0.04$ ) (**figure 2**).

*Association between cDPP3 kinetics and 30-day mortality.*

The population was further subdivided into four subgroups according to cDPP3 kinetics between inclusion and H72, based on the 40 ng/mL cutoff: low to low (LL), low to high (LH), high to low (HL) and high to high (HH) cDPP3. Patients with sustained high cDPP3 (HH) had a very poor prognosis with a 74% mortality rate at day 30. In comparison, patients with high initial but decreased cDPP3 at H72 (HL) had a markedly reduced 30-day mortality (HR 0.22 [0.11–0.44],  $p < 0.0001$ ; aHR=0.17 [0.084–0.34],  $p < 0.0001$ ), comparable to patients with sustained low cDPP3 (HR=0.25 [0.14–0.46],  $p < 0.0001$ ; aHR=0.23 [0.12–0.41],  $p < 0.0001$ ) (**figure 3**). The prognostic value of cDPP3 kinetics was similar whether CS was due to AMI or not (**supplemental figure S4**).

*Association between cDPP3 kinetics and the need for organ support.*

The median number of days alive without cardiovascular support was significantly higher in the LL group (22 days [IQR 7–26]) compared to HL (16 days [IQR 3.0–26]) and HH (0 day [IQR 0–2]),  $p < 0.0001$ . Additionally, sustained high cDPP3 was associated with the highest need for renal replacement therapy and invasive mechanical ventilation within the first 30 days whereas sustained low cDPP3 was consistently associated with the lowest rate of organ support (**figure 4**).

## **Discussion**

The present study shows that baseline cDPP3 and its kinetics were associated with 30-day mortality and organ failure in a cohort of patients suffering from cardiogenic shock of various causes. These data confirm previous results obtained in other cohorts mostly including patients with AMI-induced CS and suggest that cDPP3 is also of prognostic interest during CS of other etiologies.

Surprisingly, subgroups analyses showed that the prognostic value of baseline cDPP3 appears more pronounced in the non-AMI population suggesting that the prognostic value of cDPP3 could differ according to the underlying cause of CS.

Additionally, the present cohort included more patients receiving MCS than previous studies and, with the limitation of the small size of this subpopulation, our results suggest that the value of baseline cDPP3 in patients supported by MCS is uncertain. This novel finding could be ascribed to a putative higher frequency of hemolysis, a common phenomenon during MCS known to be associated with DPP3 release secondary to red blood cells lysis, and a potential confounding factor (11). Alternatively, as MCS is a temporizing therapy, it is conceivable that the prognosis of these patients is more related to their ability to recover (bridge to recovery) or to their eligibility to more definitive options (bridge to destination therapy or transplantation) than to the concentration of cDPP3 and its potential deleterious effects.

Additionally, our work confirms that cDPP3 kinetics is a strong prognostic factor, associated with mortality and the burden of organ support. This constant finding highlights the potential of cDPP3 monitoring to guide clinical decision aiming at escalating therapies if cDPP3 is continuously high or de-escalating therapies if high initial cDPP3 rapidly decreases to normal values. Additionally, data from animal models suggest that persistently high cDPP3 is associated with biochemical disturbances that perpetuate organ failure by negatively affecting vascular tone, inotropy and/or renal hemodynamics (6). Thus, mirroring animal models, a therapy aimed at rapidly lowering cDPP3 concentration and thus activity could translate into improved outcomes.

Our work also has several limitations: First, this is an ancillary study of a previously published randomized clinical trial performed in 4 German centers with other objectives. Therefore, our results should be considered exploratory. Second, the pragmatic design of the trial and of data collection translated into few variables available for multivariate analysis. Thus, it was not possible to assess the added value of cDPP3 compared to classical prognostic scores such as the CARDSHOCK score or the Cardiogenic Shock Score (2,13). However, we adjusted for age and gender, two strong prognostic factors (2). Third, In ACCOST-HH, the main cause of non-AMI shock was represented by septic cardiomyopathy which represents a particular population, often under-represented in cardiogenic shock studies. The prognostic value of cDPP3 in this subpopulation of CS appears consistent with previous studies in sepsis and septic shock populations (3,12). Nevertheless, the prognostic value of cDPP3 in other subpopulations

of cardiogenic shock such as acute decompensated heart failure, severe arrhythmia, or CS due to valvular causes remains to be determined. At last, most MCS were implanted before inclusion in the study, thus precluding any analysis of the predictive value of cDPP3 for subsequent MCS requirement.

This study adds to the body of evidence identifying cDPP3 as an important prognostic factor during circulatory failure, particularly cardiogenic shock. Future work may be directed in several axes:

The prognostic value of cDPP3 according to the cause of CS should be further investigated. This aspect is of utmost importance as an anti-DPP3 antibody termed procizumab has shown its efficacy in pre-clinical models of circulatory failure and is currently being developed for human use (6,8). Identifying the situations where high cDPP3 is most strongly associated with negative outcomes would help to better identify patients most likely to benefit from procizumab (14).

Finally, patients supported by MCS represent a specific population which should be further investigated. Notably, the value of cDPP3 in predicting the subsequent need for MCS; whether cDPP3 concentration under MCS has a prognostic value and/or whether cDPP3 kinetics is associated with MCS weaning should be determined.

## **Conclusion**

The present study confirms that cDPP3 and its kinetics are associated with 30-day mortality and the need for organ support in a large and diverse population of cardiogenic shock. The prognostic value of cDPP3 in patients under MCS warrants further investigations.

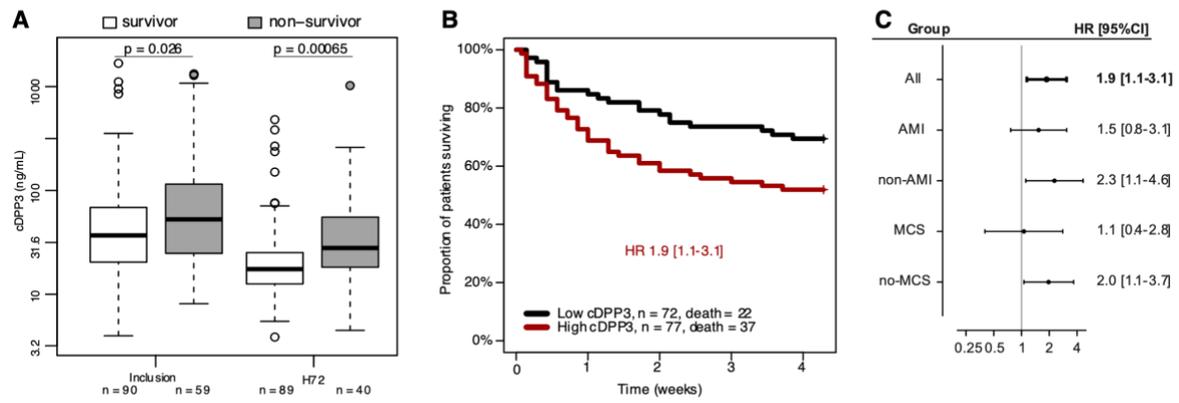
## References

1. van Diepen S, Katz JN, Albert NM, Henry TD, Jacobs AK, Kapur NK, et al. Contemporary Management of Cardiogenic Shock: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Oct 17;136(16):e232–68.
2. Beer BN, Jentzer JC, Weimann J, Dabboura S, Yan I, Sundermeyer J, et al. Early risk stratification in patients with cardiogenic shock irrespective of the underlying cause - the Cardiogenic Shock Score. *Eur J Heart Fail*. 2022 Apr;24(4):657–67.
3. Deniau B, Picod A, Van Lier D, Vaittinada Ayar P, Santos K, Hartmann O, et al. High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort. *Br J Anaesth*. 2022 Feb;128(2):e54–7.
4. 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 Lond Engl*. 2020 Apr 22;24(1):168.
5. Wenzl FA, Bruno F, Kraler S, Klingenberg R, Akhmedov A, Ministrini S, et al. Dipeptidyl peptidase 3 plasma levels predict cardiogenic shock and mortality in acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2023 Aug 26;ehad545.
6. 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*. 2020 Feb;22(2):290–9.
7. Takagi K, Blet A, Levy B, Deniau B, Azibani F, Feliot E, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial. *Eur J Heart Fail*. 2020 Feb;22(2):279–86.
8. 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.
9. Karakas M, Akin I, Burdelski C, Clemmensen P, Grahn H, Jarczak D, et al. Single-dose of adreuzumab versus placebo in acute cardiogenic shock (ACCOST-HH): an investigator-initiated, randomised, double-blinded, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Respir Med*. 2022 Mar;10(3):247–54.

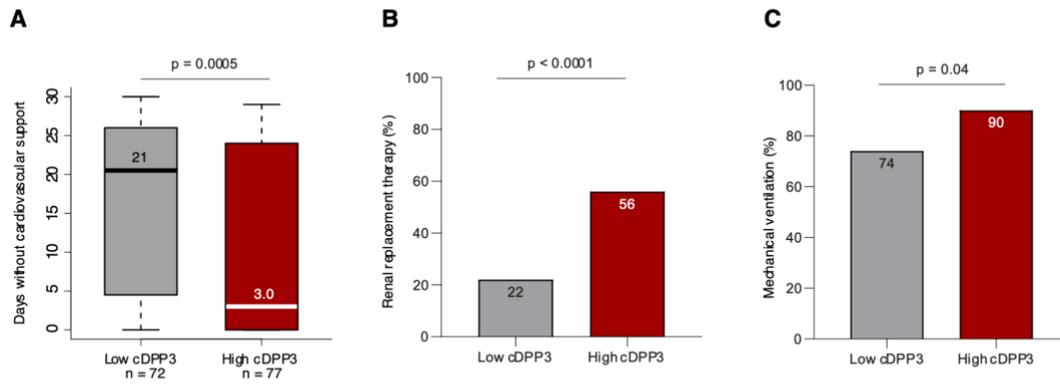
10. Skurk C, Rottbauer W, Kessler M, Akin I, Kluge S, Burdelski C, et al. The ACCOST-HH Trial. *Eur Heart J*. 2020 Dec 1;41(45):4296–8.
11. Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergmann A. Novel Methods for the Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples. *J Appl Lab Med*. 2019 May 1;3(6):943–53.
12. Blet A, Deniau B, Santos K, van Lier DPT, Azibani F, Wittebole X, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit Care Lond Engl*. 2021 Feb 15;25(1):61.
13. Harjola VP, Lassus J, Sionis A, Køber L, Tarvasmäki T, Spinar J, et al. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail*. 2015 May;17(5):501–9.
14. Pöss J, Büttner P, Thiele H. Circulating dipeptidyl peptidase 3 - New hope for a specific treatment to improve prognosis in cardiogenic shock? *Eur Heart J*. 2023 Aug 26;ehad568.

	Available n	All n = 149	cDPP3 <sup>LOW</sup> n = 72	cDPP3 <sup>HIGH</sup> n = 77	p
<b>Patients' characteristics</b>					
Age, years [IQR]	149	70 [57-77]	68 [58-78]	71 [57-77]	0.9183
BMI, kg/m <sup>2</sup> [IQR]	96	26.2 [23.5-29.4]	25.4 [23.6-29.4]	26.3 [23-29.4]	0.5117
Sex, female, n (%)	149	31 (20.8)	21 (29.2)	10 (13)	0.0258
<b>Comorbidities</b>					
Diabetes melitus, n (%)	149	37 (24.8)	20 (27.8)	17 (22.1)	0.5385
Hypertension, n (%)	149	62 (41.6)	29 (40.3)	33 (42.9)	0.8785
<b>Cause of shock, AMI, n (%)</b>	149	77 (51.7)	35 (48.6)	42 (54.5)	0.5752
<b>Clinical presentation</b>					
SAP, mmHg [IQR]	148	96 [84-105]	98 [87-109]	94 [80-100]	0.0171
DAP, mmHg [IQR]	148	52 [46.75-59]	51 [45.5-58]	53 [48-60]	0.2492
HR, bpm [IQR]	149	79 [65-101]	77.5 [62-97]	83 [71-102]	0.1047
<b>Organ support at inclusion</b>					
Norepinephrine, n (%)	149	130 (87.2)	62 (86.1)	68 (88.3)	0.8755
Epinephrine, n (%)	149	25 (16.8)	11 (15.3)	14 (18.2)	0.7990
Dobutamine, n (%)	149	43 (28.9)	16 (22.2)	27 (35.1)	0.1216
Levosimendan, n (%)	149	26 (17.4)	8 (11.1)	18 (23.4)	0.0792
Milrinone, n (%)	149	20 (13.4)	5 (6.9)	15 (19.5)	0.0452
VA ECMO, n (%)	149	27 (18.1)	5 (6.9)	22 (28.6)	0.0013
Impella®, n (%)	149	34 (22.8)	6 (8.3)	28 (36.4)	0.0001
<b>Outcomes</b>					
ICU LOS, days [IQR]	148	13 [7-24]	13 [7-21]	11 [6-26]	0.9341
Day-30 mortality, n (%)	149	59 (39.6)	22 (30.6)	37 (48.1)	0.0439
Day-90 mortality, n (%)	149	67 (45)	25 (34.7)	42 (54.5)	0.0235

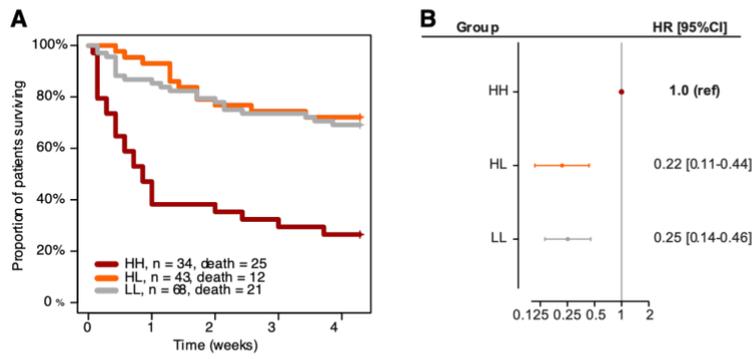
**Table 1.** Patients' characteristics according to cDPP3 concentration at inclusion. cDPP3<sup>LOW</sup> and cDPP3<sup>HIGH</sup> refers to cDPP3  $\leq$  40 ng/mL or  $>$  40 ng/mL, respectively. cDPP3: Circulating dipeptidyl peptidase 3, BMI: Body mass index, SAP: Systolic arterial pressure, DAP: diastolic arterial pressure, HR: Heart rate, VA ECMO: veno-arterial extra-corporeal membrane oxygenation. ICU: Intensive care unit, LOS: Length of stay.



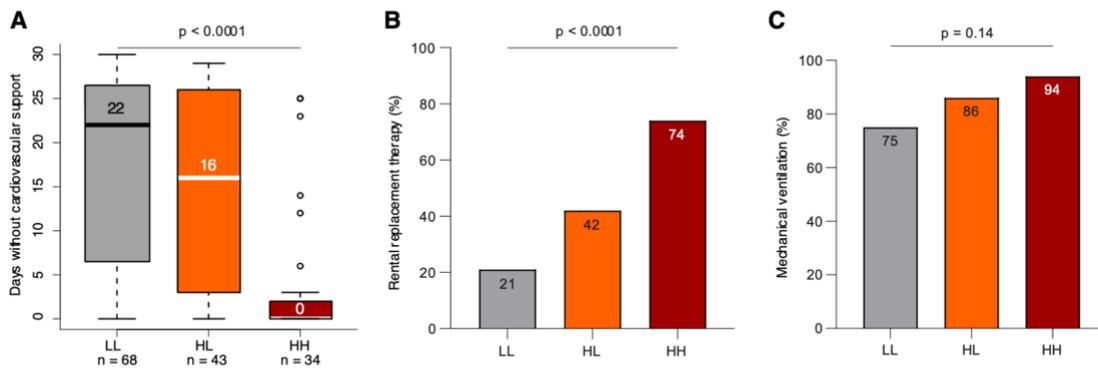
**Figure 1.** Kinetics of cDPP3 (A), association with survival in all patients (B) and subpopulations (C).



**Figure 2.** Association between baseline cDPP3 and days alive without cardiovascular support (A), need for renal replacement therapy (B) and need for invasive mechanical ventilation (C) within 30 days.

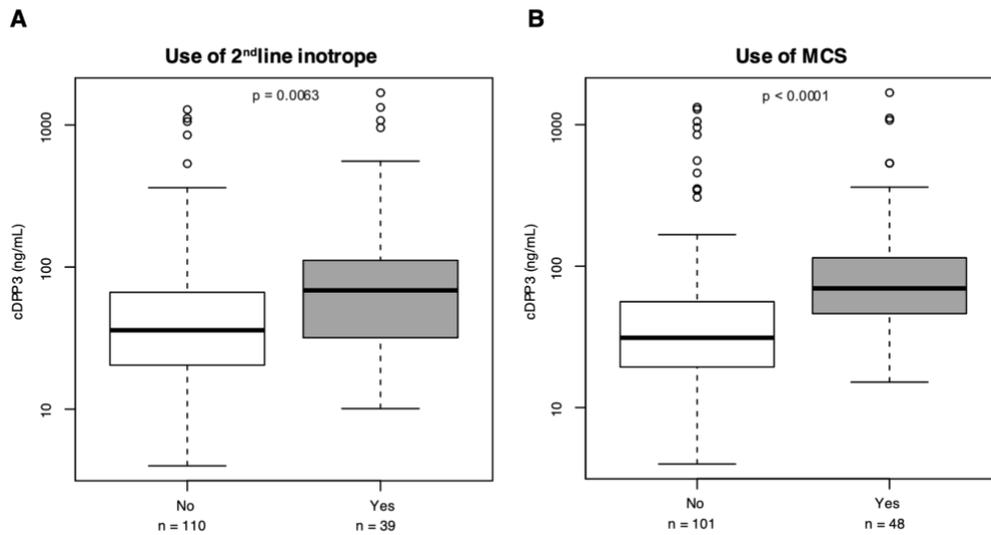


**Figure 3.** Association between cDPP3 kinetics and 30-day survival (a) and corresponding HRs (b). Due to the low number of subjects, the LH group (n=4) is not represented. For indication mortality at day 30 in this subgroup was 25% (n=1) and uHR/aHR was 0.21 [0.028-1.6]/ 0.18 [0.024-1.3].

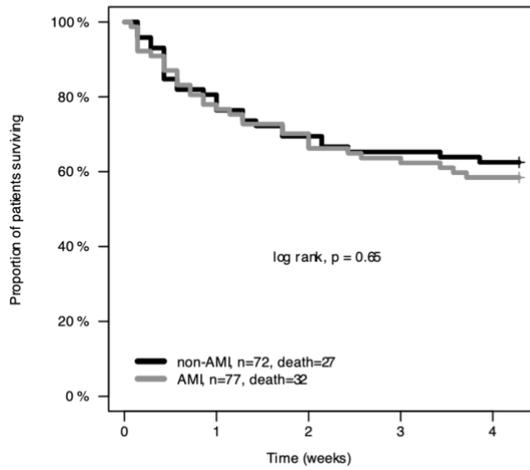


**Figure 4.** Association between cDPP3 kinetics and days alive without cardiovascular support (A), need for renal replacement therapy (B) and need for invasive mechanical ventilation (C). Due to the low number of subjects, the LH group (n=4) is not represented. For indication, the number of days alive w/o cardiovascular support for the LH group was 5.5 [0.0-13], and RRT and invasive mechanical ventilation were needed for 2 (50%) and 2 (50%) patients.

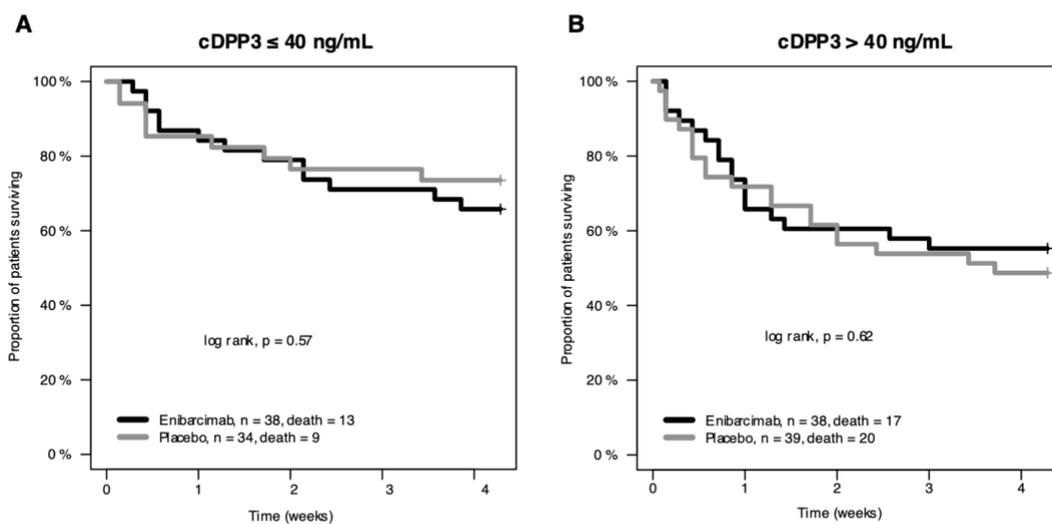
Supplementals:



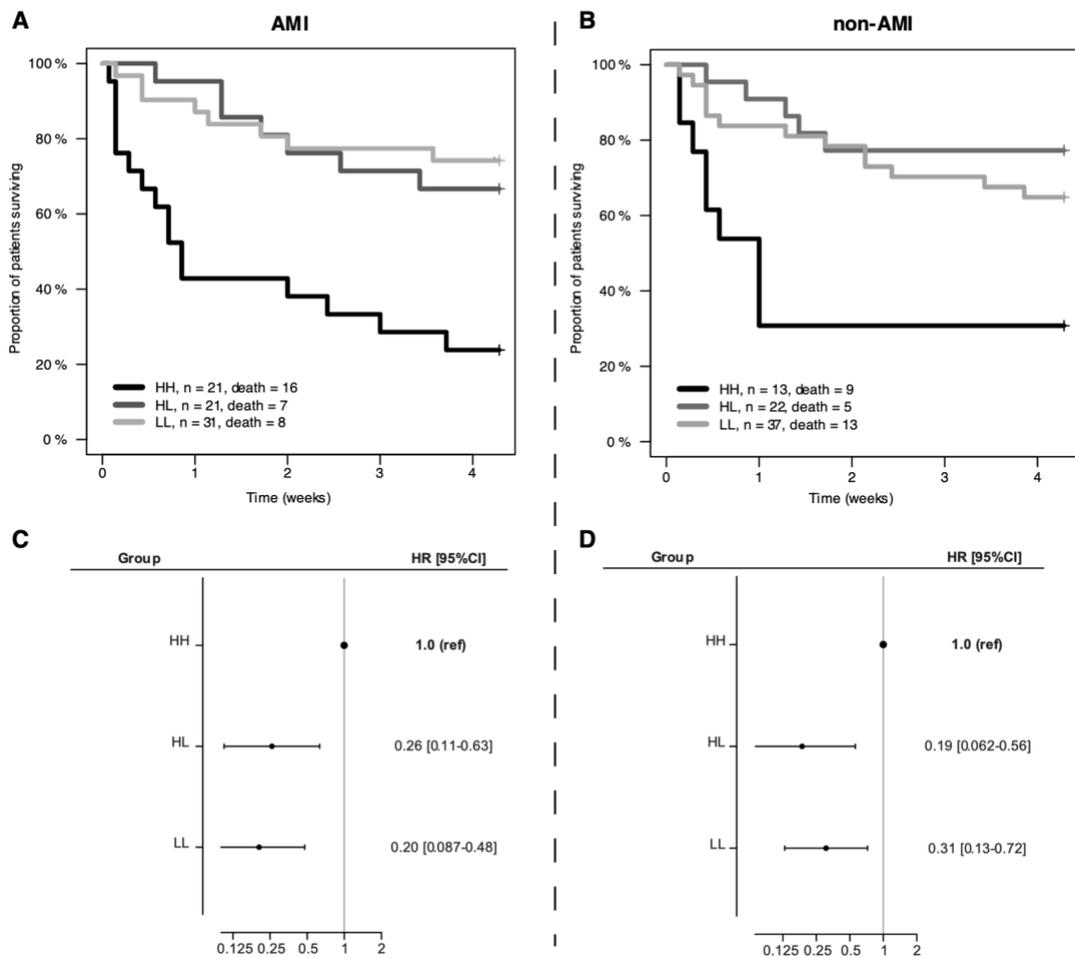
**Supplemental figure S1.** cDPP3 at baseline according to the use of second line inotropes (A) or mechanical circulatory support (B) at baseline. Second line inotrope: Levosimendan or milrinone. Mechanical circulatory support: Veno-arterial ECMO or Impella<sup>®</sup>. cDPP3: circulating dipeptidyl peptidase 3. MCS: Mechanical circulatory support.



**Supplemental figure S2.** 30-day survival according to the cause of shock. AMI: Acute myocardial infarction.



**Supplemental figure S3.** Effect of enbarcimab in low and high baseline cDPP3 subpopulations.



**Supplemental figure 4:** Associations between cDPP3 kinetics and 30-day survival in the AMI on non-AMI subpopulation (A, B) and corresponding HR (C,D). Due to the low number of subjects, the LH group (n=4) is not represented. All these subjects were in the AMI subpopulation and the associated HR was 0.21 [0.027-1.6].

## **Conflicts of Interest**

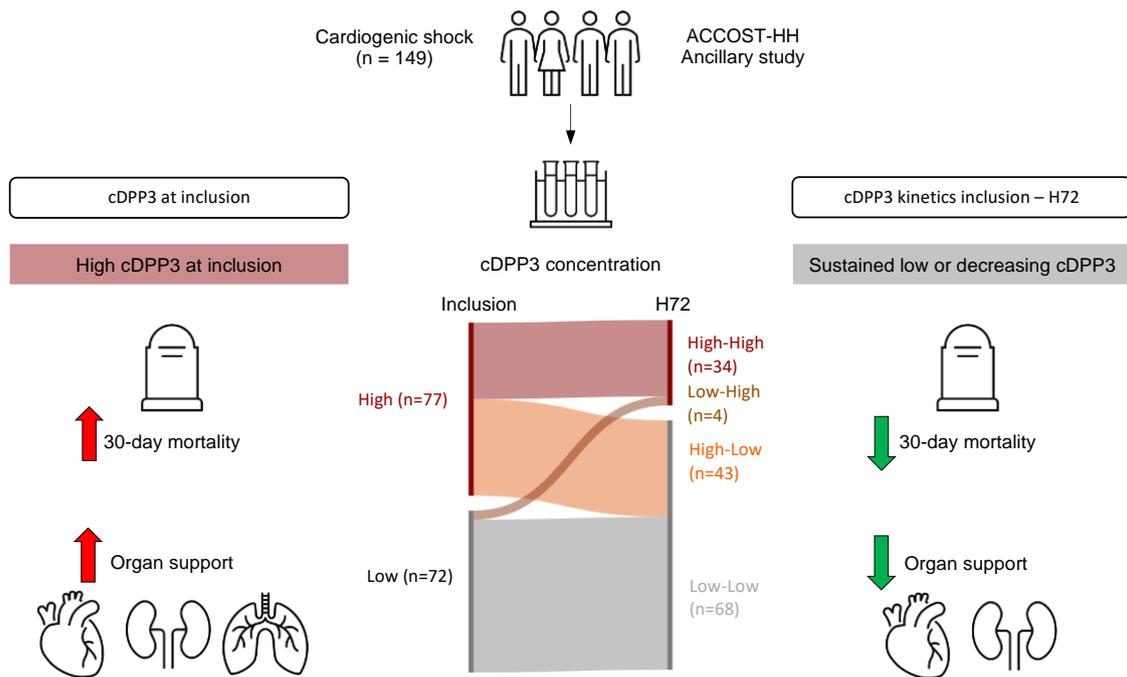
The Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT) Research Group is supported by INSERM and a research grant from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, which allowed salary support for two co-authors (AP, HN). The trial was funded by own institutional means, and by funds from the Else Kroener-Fresenius-Foundation (Else Kroener Clinician Scientist Professorship) obtained by Dr. Karakas.

Dr Mebazaa has received speaker's honoraria from Abbott, Orion, Roche, and Servier, and has received fees as a member of the advisory boards and/or steering committees and/or research grants from Bristol Myers Squibb, Adrenomed, Neurotronik, Roche, Sanofi, Sphingotec, Novartis, Otsuka, Philips and 4TEEN4.

Dr. Kluge received research support from Cytosorbents and Daiichi Sankyo. He also received lecture fees from Advitos, Biotest, Daiichi Sankyo, Fresenius Medical Care, Gilead, Mitsubishi Tanabe Pharma, MSD, Pfizer, Shionogi and Zoll. He also received consultant fees from Fresenius, Gilead, MSD and Pfizer.

Dr. Karakas is a part-time employee of 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH and received research support from CSL Vifor, Daiichi Sankyo and Adrenomed AG. He also received fees for consulting and lecture fees from Adrenomed AG, Sphingotec, Pharmacosmos, Vifor Pharma, Daiichi Sankyo.

## Graphical abstract:



**Key Question:** Is circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) linked to outcome in a contemporary population of cardiogenic shock from the ACCOST-HH trial?

**Key Finding:** High baseline cDPP3 is associated with 30-day mortality, need for cardiovascular organ support, renal replacement therapy, and mechanical ventilation. At H72, sustained low or decreasing cDPP3 is associated with markedly reduced 30-day mortality and need for organ support.

**Take-home Message:** cDPP3 and its kinetics are linked to outcomes in cardiogenic shock, underscoring its potential as a therapeutic target.

## 2.4 Discussion

Ce travail démontre que la concentration initiale de cDPP3 et sa cinétique au cours des premiers jours est associée à la mortalité à court terme et aux recours aux supports d'organe au sein d'une cohorte contemporaine de patients souffrant de choc cardiogénique de causes diverses. Ces données confirment les résultats obtenus dans les travaux précédents ayant inclus principalement des patients avec un état de choc cardiogénique de cause ischémique et suggèrent que cDPP3 est un biomarqueur d'intérêt également au cours du choc cardiogénique de cause non ischémique.

Néanmoins, les analyses en sous-groupes réalisées dans cette étude suggèrent que la valeur pronostique de la concentration de cDPP3 puisse différer selon la cause sous-jacente du choc cardiogénique. Le caractère secondaire de cette analyse empêche néanmoins une conclusion définitive.

De plus, la population de ACCOST-HH comportait plus de patients recevant une assistance circulatoire mécanique transitoire de type ECMO veino-artérielle ou Impella® que les études précédentes. La concentration de cDPP3 dans cette sous-population ne semblait pas associée au pronostic. Là encore ce résultat doit être considéré comme exploratoire. Deux hypothèses pourraient expliquer cette donnée nouvelle. Les patients sous assistance circulatoire mécanique pourraient présenter une plus grande fréquence d'hémolyse intravasculaire, un phénomène connu pour être associé au relargage du contenu intra-érythrocytaire en DPP3 et constituant donc un potentiel facteur confondant. Par ailleurs, il est concevable que le pronostic des patients assistés soit plus directement lié à la capacité de récupération myocardique (*bridge to recovery*) ou l'éligibilité du patient à une option plus définitive (*bridge to destination therapy* ou *bridge to transplantation*) qu'au taux de cDPP3 circulant et à ses potentiels effets hémodynamiques délétères.

Additionnellement, ce travail confirme que la cinétique de cDPP3 est un facteur pronostique fort, associé à la survie et au recours à des supports d'organes. Ce résultat constant souligne le potentiel du monitoring de la concentration de cDPP3 pour guider la décision clinique d'incrémenter le support d'organe si cDPP3 s'élève ou au contraire, de désescalader si un taux initialement élevé de cDPP3 diminue sous le seuil critique de 40 ng/mL.

Ce travail présente plusieurs limites. Tout d'abord, il s'agit d'une étude ancillaire d'un essai randomisé qui avait pour objectif initial d'évaluer une nouvelle thérapeutique au cours du choc cardiogénique. Ainsi la population incluse dans ACCOST-HH était dimensionnée pour répondre à la question de l'efficacité de l'enibarcimab et l'effectif disponible ne permet pas d'obtenir une puissance suffisante pour conclure avec certitude dans les analyses secondaires menées.

De plus, la conception pragmatique de l'essai et de la collection de données se traduit par un faible nombre de variables disponibles pour la réalisation d'analyses multivariées. Notamment, n'étaient pas disponibles de façon standardisée les valeurs de la lactatémie, glycémie ou créatininémie à l'inclusion. Pour cette raison il n'a pas été possible d'évaluer la valeur ajoutée de la concentration de cDPP3 vis-à-vis des scores pronostiques existants tels le *Cardshock Score* ou le *Cardiogenic Shock Score*<sup>237,238</sup>. Néanmoins, les analyses ont pu être ajustées sur l'âge et le sexe, deux facteurs pronostiques reconnus<sup>238</sup>.

Dans l'essai ACCOST-HH, la cause exacte des états de choc cardiogéniques non liés à un infarctus du myocarde n'était pas colligée. Néanmoins les données disponibles suggèrent une prévalence importante de chocs cardiogéniques secondaires à une cardiomyopathie septique. Cette sous-population n'est classiquement pas incluse dans les essais concernant le choc cardiogénique. La valeur pronostique de la concentration de cDPP3 dans cette population apparaît cohérente avec les résultats des études menées dans une population de patients souffrant de choc septique<sup>152</sup>. Toutefois, la valeur pronostique de cDPP3 au cours du choc cardiogénique secondaire à d'autres causes fréquentes telles que l'insuffisance cardiaque chronique décompensée reste inconnue.

Enfin, la quasi-totalité des assistances circulatoires mécaniques étaient déjà en place au moment de l'inclusion dans ACCOST-HH. L'association entre la concentration de cDPP3 initiale et le recours ultérieur à l'assistance circulatoire n'a donc pas pu être évaluée.

Les travaux futurs pourraient s'orienter selon plusieurs axes :

Tout d'abord, la valeur pronostique de la concentration de cDPP3 en fonction de la cause du choc cardiogénique devrait être étudiée plus précisément. Il apparaît pour cela nécessaire de recueillir avec précision l'entité en cause afin d'obtenir des résultats concluants. Une telle étude devrait idéalement être multicentrique afin d'inclure un large éventail étiologique et un nombre suffisant de patients pour garantir une puissance suffisante pour des analyses statistiques en sous-groupe.

Par ailleurs, les patients recevant une assistance circulatoire mécanique représentent une population spécifique nécessitant des études dédiées. Notamment, pourraient être évaluées :

- L'association entre la concentration initiale de cDPP3 et le besoin ultérieur d'assistance. Alternativement, puisque qu'aucune étude n'a pu mettre en évidence de bénéfice clinique à l'implantation d'une assistance circulatoire, cDPP3 pourrait être évalué comme un biomarqueur d'enrichissement potentiel permettant de sélectionner des patients chez qui la balance bénéfique/risque de l'assistance est plus favorable.
- L'association entre la cinétique de cDPP3 chez les patients assistés avec le délai de sevrage de l'assistance et/ou le succès du sevrage.

Pour conclure, cette étude confirme, au sein d'une population contemporaine de chocs cardiogéniques de causes diverses, l'association entre concentration de cDPP3 initiale ou son profil cinétique et le devenir à court terme. Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser la valeur pronostique de cDPP3 selon la cause sous-jacente du choc cardiogénique ainsi que dans le sous-groupe de patients sous assistance circulatoire mécanique.

## Partie II. Rôle physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 au cours de l'insuffisance circulatoire.

3. Rôle potentiel de la dipeptidyl peptidase 3 circulante dans les altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone au cours de l'insuffisance circulatoire.

### 3.1 Introduction

Des données émergentes suggèrent l'existence de perturbations du SRAA au cours de l'insuffisance circulatoire distributive, et notamment au cours du choc septique. Ces altérations seraient responsables d'une stimulation inadéquate de AT1R ayant pour conséquences primaires la majoration de l'hypotension et l'apparition d'une insuffisance rénale. Des données cliniques ont ainsi souligné des concentrations insuffisantes d'angiotensine II au cours de l'état de choc distributif<sup>197</sup>. Cette observation contraste avec des taux constamment augmentés d'angiotensine I. En raison de l'élévation du ratio angiotensine I / angiotensine II, ces perturbations ont été attribuées en premier lieu à un défaut d'activité ECA1<sup>195</sup>. Si cette hypothèse est crédible, confortée notamment par des données issues de patients présentant une agression pulmonaire aiguë associée au sepsis<sup>198-200</sup>, il est plus probable que plusieurs mécanismes concourent au défaut de signalisation via AT1R.

Dans une lettre à l'éditeur de l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* commentant l'article de *Bellomo et al.*, évoquant l'hypothèse du défaut en ECA1 comme explication aux perturbations du SRAA au cours de l'état de choc septique, nous avons mis en avant le rôle potentiel de cDPP3 et notamment la possibilité que cDPP3 affecte directement le ratio angiotensine I / angiotensine II.

5. Badagliacca R, Papa S, Matsubara H, Lang IM, Poscia R, Manzi G, et al. The importance of right ventricular evaluation in risk assessment and therapeutic strategies: raising the bar in pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol* 2020;301:183–189.

Copyright © 2021 by the American Thoracic Society

Check for updates

**Alteration of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3**

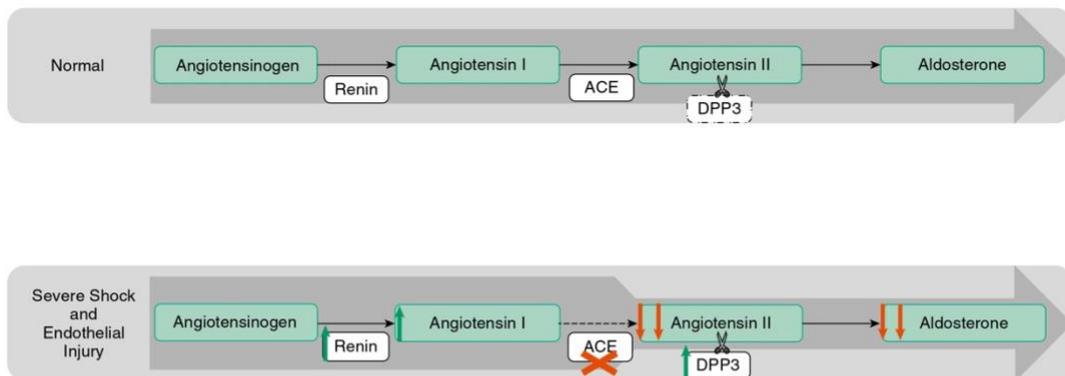
To the Editor:

We read with interest the article published by Bellomo and colleagues, which explored some of the alterations of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) during catecholamine-resistant vasodilatory shock, mostly of septic origin, using data from the ATHOS-3 (Phase 3 Angiotensin II for the Treatment of High-Output Shock) trial (1). In this work, the authors demonstrated that there was increased renin concentration in most patients, which was associated with a high angiotensin I/angiotensin II ratio and a bad prognosis (2). As the latter ratio is inversely associated with ACE (angiotensin-converting enzyme) activity, the authors suggest that RAAS perturbations might be related to a decrease in ACE activity in the context of sepsis-associated endotheliopathy. We would like to

propose another, coexisting rather than competing, hypothesis of the RAAS perturbation observed during septic shock. As highlighted by Bellomo and colleagues (1), insufficient activation of the AT1R (angiotensin II type 1 receptor) can be caused by AT1R blockade or decreased angiotensin II generation by ACE. On the basis of recent discoveries, we propose enhanced degradation of angiotensin II as a third possibility related to an excess release of DPP3 (dipeptidyl peptidase 3) in the plasma of patients with septic shock (3).

DPP3 is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves the N-terminal extremity of various bioactive peptides, including angiotensins, enkephalins, and endorphins (4). Interestingly, although DPP3 hydrolyzes angiotensin II into angiotensin IV, it has no direct effect on angiotensin I, thus leading to an increased angiotensin I/angiotensin II ratio, consistent with Bellomo and colleagues' findings (5, 6). Under these conditions, as pointed out by the authors, decreased AT1R stimulation then triggers the production of renin.

Although the plasmatic concentration of DPP3 is low in healthy subjects, an increase in plasmatic DPP3 concentration and activity has been observed in patients with sepsis. In addition, DPP3 activity is higher in septic shock than in severe sepsis and higher in decedents than in survivors of septic shock (3). In a rat model of septic shock with septic cardiomyopathy induced by cecal ligation and puncture, circulating DPP3 activity is also increased (7). Furthermore, in this preclinical model, inhibition of DPP3 activity with procuzumab ( $\alpha$ -DPP3 monoclonal antibody) quickly restored cardiac function as



**Figure 1.** An alternative renin–angiotensin–aldosterone system–disturbance hypothesis. Adapted from Reference 1. ACE = angiotensin-converting enzyme; DPP3 = dipeptidyl peptidase 3. Green arrows: increased concentration. Red arrows: decreased concentration. Red X: insufficient activity.

This article is open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). For commercial usage and reprints, please contact Diane Gern (dgern@thoracic.org).

The Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT) Research Group is supported by an unrestricted research grant from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, which allowed salary support for one co-author (B.D.).

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.202010-3873LE on November 5, 2020

measured by left ventricular shortening fraction and improved survival (7). However, the exact mechanism behind the beneficial hemodynamic effect of DPP3 inhibition remains to be identified.

Notably, and despite some substantial biological rationale, it remains uncertain whether angiotensin II infusion alone is able to recapitulate the beneficial effects of DPP3 inhibition. Indeed, although this therapy has been associated with an AT1R-dependent increment of cardiac output in a mouse model of sepsis (8), this is a rather inconstant finding in humans, in whom angiotensin II is

generally considered to be a pure vasopressor devoid of a direct inotropic effect. Nonetheless, whether angiotensin II exerts an inotropic effect could be dependent on the type of aggression and basal cardiac function, as well as on the endogenous concentration of angiotensin II, and deserves further explorations in animal models and patients.

In conclusion, this additional hypothesis gives a glimpse into the complex picture of the RAAS perturbations during shock (Figure 1), emphasizes the need for further research in this area, and expands the spectrum of potential therapeutic targets. ■

**Author disclosures** are available with the text of this letter at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

Adrien Picod, M.Sc.  
Benjamin Deniau, M.D., Ph.D.  
Prabakar Vaittinada Ayar, M.D.  
INSERM U942 MASCOT  
Paris, France  
and  
University of Paris  
Paris, France

Magali Genest, Ph.D.  
INSERM U942 MASCOT  
Paris, France

Nathan Julian, M.D., M.Sc.  
INSERM U942 MASCOT  
Paris, France  
and  
University of Paris  
Paris, France

Feriel Azibani, Ph.D.\*  
INSERM U942 MASCOT  
Paris, France

Alexandre Mebazaa, M.D., Ph.D.\*<sup>†</sup>  
INSERM U942 MASCOT  
Paris, France  
and  
University of Paris  
Paris, France

On behalf of the MASCOT Research Group

ORCID ID: 0000-0002-0639-5598 (A.P.).

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>†</sup>Corresponding author (e-mail: [alexandre.mebazaa@aphp.fr](mailto:alexandre.mebazaa@aphp.fr)).

## References

- 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;202:1253–1261.
- Bellomo R, Wunderink RG, Szerlip H, English SW, Busse LW, Deane AM, *et al*. Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. *Crit Care* 2020; 24:43.
- Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergmann A. Novel methods for the quantification of dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) concentration and activity in human blood samples. *J Appl Lab Med* 2019;3:943–953.
- Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* 2011;278:3256–3276.
- 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* 2020;22:290–299.
- 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;295:13711–13723.
- 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:e0238039.
- Leisman DE, Fernandes TD, Bijol V, Abraham MN, Lehman JR, Taylor MD, *et al*. Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis induced acute kidney injury. *Kidney Int* [online ahead of print] 31 Aug 2020; DOI: 10.1016/j.kint.2020.07.047.

Copyright © 2021 by the American Thoracic Society



Reply to Picod *et al*.



From the Authors:

We thank Picod and colleagues for their comments about our manuscript (1). The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is disordered in patients with catecholamine-resistant vasodilatory shock (CRVS). Thus, we have described the RAAS Disturbance Hypothesis, which postulates that there is inadequate activation of the ATR1 (angiotensin type I receptor) in some patients with CRVS. In our study, we demonstrated that elevated renin levels are common in patients with CRVS and that the renin levels correlate with the angiotensin I/angiotensin II ratio, which is also elevated (1). We reasoned that ACE (angiotensin-converting enzyme) dysfunction was the most likely cause for these findings. This hypothesis is bolstered by our findings that the exogenous administration of angiotensin II resulted in a rapid decrease in both renin and angiotensin I levels compared with placebo. Picod and colleagues rightly point out that increased angiotensin II degradation by neutral endopeptidase offers an additional explanation for our findings. We agree that this is important and that further research into the nature and cause of angiotensin II insufficiency and the role of both classical and nonclassical enzymes (ACE, ACE2, and/or neutral endopeptidase) in the generation and degradation of the different major angiotensins identified so far (especially angiotensin I, angiotensin II, angiotensin 1-7, angiotensin 1-9, and angiotensin 15) is warranted.

The consequences of RAAS disturbance in CRVS are broad and impact multiple organs. Preclinical studies confirm early findings by Wan and colleagues that adequate ATR1 engagement is critical for renal function (2). Recently, Leisman and colleagues demonstrated

This article is open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). For commercial usage and reprints, please contact Diane Gem (dgem@thoracic.org).

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.202010-3968LE on November 5, 2020

### 3.3 Discussion

Cette correspondance souligne que des mécanismes multiples puissent aboutir à un défaut de stimulation d'AT1R incluant le défaut de génération d'angiotensine II, par exemple dû à un défaut d'activité ACE ; mais aussi une dégradation accrue de l'angiotensine II, par exemple via l'augmentation de l'activité cDPP3.

De manière intéressante, la réponse faite par les auteurs met en évidence la méconnaissance du rôle potentiel de DPP3, cette enzyme étant confondue avec la NEP <sup>239</sup>. En effet, bien que cette enzyme ait été identifiée depuis plus de 50 ans, le rôle exact de DPP3 dans le métabolisme des angiotensines circulantes reste imprécis, et donc souvent négligé.

## 4. Modulation de l'hémodynamique systémique et rénale par la dipeptidyl peptidase 3 circulante

### 4.1 Introduction

Si les travaux précédents soulignent la valeur pronostique de concentrations élevées de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire, peu de données étayent un rôle physiopathologique.

Des données de notre laboratoire ont apporté des éléments préliminaires en faveur d'un rôle de cDPP3 dans la modulation de l'hémodynamique ainsi que la preuve de concept que cDPP3 pouvait constituer une cible thérapeutique dans des modèles d'insuffisance circulatoire <sup>151,154</sup>. Ainsi, les études menées ont montré que l'injection intraveineuse de DPP3 purifiée à la souris saine était associée à l'altération transitoire de la fonction ventriculaire gauche <sup>151</sup>. A l'inverse, l'administration d'un anticorps monoclonal inhibant l'activité de cDPP3 dans des modèles murins de dysfonction cardiaque était associé à une amélioration de la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche <sup>151,154</sup>. Néanmoins, les mécanismes précis ainsi que l'effet de DPP3 sur d'autres variables hémodynamiques importantes restent inconnus. Notamment, les effets de DPP3 sur la pression artérielle sont insuffisamment explorés. Enfin, il a été suggéré que l'administration de DPP3 altère l'hémodynamique rénale soit secondairement à une altération de l'hémodynamique systémique, soit en raison d'un effet plus spécifique sur la circulation rénale <sup>151</sup>.

Ainsi, le travail suivant visait à explorer les effets de cDPP3 sur l'hémodynamique systémique et rénale chez la souris et d'investiguer la relation entre les effets observés et les substrats connus de cDPP3, et notamment, les peptides du SRAA.

**Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.**

**URL:** <https://hype-submit.aha-journals.org/>

**Manuscript Number:** HYPE/2023/21913

**Title:** Circulating dipeptidyl peptidase 3 modulates systemic and renal hemodynamics through angiotensins cleavage

**Authors:**

Adrien PICOD (AP-HP - Lariboisiere hospital - INSERM U942)

Sandrine Placier (INSERM UMRS 1155)

Magali Genest (INSERM UMR-S1155)

Jacques Callebert (Lariboisiere Hospital)

Nathan Julian (INSERM UMR-S 942)

Maxime Zalc (INSERM UMR-S 942)

Noma Assad (INSERM UMR-S 942)

Karine Santos (4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH)

Stéphane Gaudry (INSERM UMR-S 1155)

Christos Chatziantoniou (INSERM UMR-S 1155)

Alexandre Mebazaa (INSERM UMR-S 942)

Feriel Azibani (Hatter Institute for Cardiovascular Research in Africa & IIDMM; Faculty of Health Sciences; University of Cape Town)

# **Circulating dipeptidyl peptidase 3 modulates systemic and renal hemodynamics through angiotensins cleavage**

**Short title:** High circulating DPP3 modulates hemodynamics

Adrien Picod MD MSc<sup>1</sup>, Sandrine Placier BS<sup>2</sup>, Magali Genest PhD<sup>1</sup>, Jacques Calleber<sup>t</sup> PharmD PhD<sup>1,3</sup>, Nathan Julian MD MSc<sup>1,4</sup>, Maxime Zalc MD MSc<sup>1,5,6</sup>, Noma Assad MSc<sup>1</sup>, Karine Santos PhD<sup>7</sup>, Stéphane Gaudry MD PhD<sup>2,8,9</sup>, Christos Chatziantoniou PhD<sup>2</sup>, Alexandre Mebazaa MD PhD<sup>1,4</sup>, Ferial Azibani PhD<sup>1</sup>.

## **Affiliations:**

1. INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University, Paris, France
2. INSERM UMR-S 1155 CORAKID – Paris – Sorbonne University, Paris, France
3. Department of biochemistry and molecular biology, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France
4. Department of Anesthesiology and Intensive Care, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France.
5. Department of Anesthesiology and Intensive Care, Mondor hospital, APHP, Paris, France.
6. Paris Est – Créteil University, Créteil, France
7. 4TEEN4 Pharmaceuticals gmbh, Hennigsdorf, Germany
8. Sorbonne – Paris Nord University, Paris, France
9. Medical and surgical intensive care unit, Avicenne hospital, APHP, Bobigny, France

## **Corresponding author:**

Alexandre Mebazaa, MD PhD

Department of Anesthesiology and Intensive Care, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France.

Phone: (+33)1 49 95 80 71

Fax: (+33)1 49 95 69 54

Mail: Alexandre.mebazaa@aphp.fr

## **Authors' contributions:**

All the authors listed meet the ICMJE authorship criteria. AP, AM, FA designed the study. All authors contributed to data acquisition and/or interpretation. AP, AM, and FA drafted the

manuscript, and all other authors critically reviewed the work and made substantial contribution. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

### **Sources of Funding**

The Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT) Research Group is supported by INSERM and a research grant from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH.

### **Disclosures**

The Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT) Research Group is supported by a research grant from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, which allowed salary support for two co-authors (AP, MG). KS is employed by 4TEEN4 Pharmaceuticals. AM received speaker's honoraria from Abbott, Novartis, Orion, Roche, and Servier, and fees as a member of the advisory board and/or steering committee from Cardioentis, Adrenomed, MyCartis, Neurotronik, and Sphingotec. The remaining authors have nothing to disclose.

**Keywords:** Dipeptidyl peptidase 3, Renin-angiotensin system, renal blood flow, circulatory failure, angiotensins

**Word count:** 5999/6000

## **Abstract**

*Background:* High circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) has been associated with poor prognosis in critically ill patients with circulatory failure. In such situation DPP3 could play a pathological role, putatively via an excessive angiotensins cleavage.

Our objective was to investigate the hemodynamics changes induced by DPP3 in mice and the relation between the observed effects and renin-angiotensin system modulation.

*Methods:* Ten-week-old male C57Bl/6J mice were subjected to intravenous injection of purified human DPP3 or an anti-DPP3 antibody (procizumab). Invasive blood pressure and renal blood flow were monitored throughout the experiments. Circulating angiotensins peptides and catecholamines were measured and receptor blocking experiment performed to investigate the underlying mechanisms.

*Results:* DPP3 administration significantly increased renal blood flow, while blood pressure was minimally affected. Conversely, procizumab led to significantly decreased renal blood flow. Angiotensins measurements and a AT1R blockade experiment using valsartan demonstrated that the renovascular effect induced by DPP3 is due to reduced AT1R activation via decreased concentrations of circulating angiotensin II, III, IV. Measurements of circulating catecholamines and an adrenergic receptor blockade by labetalol demonstrated that catecholamine release explains blood pressure maintenance upon DPP3 administration.

*Conclusions:* High circulating DPP3 increases renal blood flow due to reduced AT1R activation via decreased concentrations of circulating angiotensins while blood pressure is maintained by means of increased circulating endogenous catecholamines. These findings strengthen the fact that circulating DPP3 is an actor of circulatory failure and contributes to renin-angiotensin system alterations and associated consequences in shock.

**Abstract word count:** 240/250

**Abbreviations**

(c)DPP3: (circulating) dipeptidyl peptidase 3

PCZ: Procizumab

AT1R: Angiotensin II receptor, type 1

RAS: renin-angiotensin system

PBS: Phosphate-buffered saline

MAP: Mean arterial pressure

RBF: Renal blood flow

RVR: Renovascular resistances

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

## Introduction

High circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) concentration has been observed in the blood of critically ill patients, notably in patients with various causes of circulatory failure including septic shock, cardiogenic shock, hemorrhagic shock, or circulatory failure associated with extensive burns (1–6). In such conditions, high cDPP3 has been associated with poor survival. Particularly relevant to the context of shock, high cDPP3 has been associated with a higher incidence of cardiac dysfunction and with the need for higher doses of catecholamine support to maintain blood pressure. Furthermore, high cDPP3 during circulatory failure has been associated with a higher incidence of acute kidney injury and a more frequent need for renal replacement therapy.

DPP3 is an enzyme cleaving two amino acids of the N-terminal extremities of small peptides, ranging from 3 to 10 amino acids. Most of its substrates have been identified in ex vivo or in vitro experiments and include angiotensins and endogenous opioids such as enkephalins and endomorphins (7–9). Low cDPP3 concentrations in the bloodstream were found in healthy animals and individuals and its role in the metabolism of its known substrates remain poorly understood. Interestingly, there is a strong correlation between cDPP3 concentration and activity in critically ill patients confirming that, in acute conditions, DPP3 is released in its active form (2, 10). This observation raises the possibility that, in addition to be a marker, high cDPP3 could contribute to circulatory failure by enhanced cleavage of vasoactive peptides. Among these peptides, angiotensin II is of particular interest, due to its effect on blood pressure maintenance, renal hemodynamics and sodium and water homeostasis. Interestingly, defective angiotensin II - angiotensin II receptor type 1 (AT1R) signaling has been reported during vasodilatory shock, with hypotension and renal dysfunction as primary consequences (11, 12). This defective signaling is classically attributed to an angiotensin converting enzyme deficiency in the setting of a sepsis- or sepsis-like endotheliopathy leading to inadequately low angiotensin II concentration (11). However, it is likely that renin-angiotensin system (RAS) alterations in severe shock are due to additional causes, like increased degradation of angiotensin II by circulating peptidases such as cDPP3 (13).

Previous studies from our group showed that intravenous DPP3 administration to healthy mice was associated with impairment of cardiac function (2). Inversely, administration of a monoclonal antibody inhibiting cDPP3 activity in mouse models of acute cardiac dysfunction was associated with improved left ventricular shortening fraction (2, 14). However, the precise

mechanism and cDPP3 effects on other important hemodynamic variables remains largely unknown. Notably, the consequences of high cDPP3 on blood pressure are insufficiently characterized. Additionally, it has been suggested that DPP3 administration alters renal hemodynamics, either as a consequence of systemic hemodynamics impairment or due to a more specific effect on the renal vasculature (2). Thus, the present work aimed to determine the effects of cDPP3 on systemic and renal hemodynamics and the relationship between the observed effects and the modulation of the RAS in mice.

## **Materials and methods**

### *Animals*

A total of 298 ten-week-old male C57Bl/6J mice, weighting  $25 \pm 2.5$  g purchased from Janvier Lab were used in all experiments. Mice were housed with a 12/12 h light-dark cycle and with ad libitum access to food and water. All experimental procedures were performed in accordance with the Directive 2010/63/eu of the European Union. The study received approval from the ethics committee Lariboisière–Villemin (S140#9385). Reporting of this work complies with ARRIVE 2.0 guidelines.

### *Modulation of cDPP3 activity*

Native human DPP3 (hDPP3) was purified from human red blood cell lysate as previously described and administered in all experiments as an intravenous bolus injection of 0.55 mg/kg in 100  $\mu$ L (15). This dose of hDPP3 was chosen to produce a peak concentration approximately 10x higher than observed in human pathological conditions given: i) the rapid decrease in concentration (hDPP3 half-life 20 min), and ii) the basal angiotensin II concentration in mice, which is approximately 10x higher than in humans (2).

The monoclonal antibody procizumab (PCZ), an immunoglobulin G1 inhibiting DPP3 activity, was generated as previously described and administered in all experiments as an intravenous bolus injection of 10 mg/kg in 100  $\mu$ L (2).

Both hDPP3 and PCZ were provided by 4TEEN4 pharmaceuticals GmbH (Hennigsdorf, Germany), diluted in sterile phosphate-buffered saline buffer (hDPP3) or formulation buffer containing 10mM L-histidine, 20mM L-methionine, 250mM trehalose (PCZ). Phosphate-buffered saline (PBS) was used as a control injection in all experiments. Mice were randomly allocated to each condition and PBS, PCZ or hDPP3 blindly administered.

### *Hemodynamic experiments*

Continuous measurements of hemodynamic variables were performed in anesthetized mice according to previously established methodology (16). Briefly, after anesthesia by inhaled isoflurane (3% for anesthesia induction then reduced to 1% for maintenance) and analgesia with subcutaneous injection of buprenorphine 0.05 mg/kg, animals were placed on a servo-controlled table kept at 37°C. The right femoral artery was catheterized for measurements of arterial pressure, and a femoral venous catheter was used for volume replacement and administration of pharmacological agents. Sodium chloride (0.9%) was intravenously infused at a rate of 10  $\mu$ L/min for fluid maintenance. Mean arterial pressure (MAP) was measured via a pressure transducer (Statham P23 DB). Renal blood flow (RBF) was measured by a flowmeter placed around the left renal artery via left lombotomy (0.5-vol probe, TS420, Transonic Systems, Ithaca, NY). RBF values were controlled for zero offset, which was determined at the end of an experiment after cardiac arrest. Renovascular resistance (RVR) was estimated as the ratio of MAP/RBF. Data were recorded, stored, and analyzed using a DataTranslation analog-to-digital converter and IOX software (EMKA Technologies, Paris, France). RBF and MAP were measured before and after intravenous 100 $\mu$ L bolus injections of 0.55 mg/kg hDPP3, 10mg/kg procizumab or PBS. In some experiments, 0.8 mg/kg valsartan (Sigma Aldrich, Saint-Louis, United States), 1.6 mg/kg naloxone (Mylan, Canonsburg, United states) or 10 mg/kg labetalol (Aspen Pharmacare, Dublin, Ireland) was administered as a single intravenous bolus injection of 100  $\mu$ L, 5 min before hDPP3 (0.55 mg/kg). Untreated animals received a bolus of 100  $\mu$ L 0.9% sodium chloride.

In separate experiments, the systemic (MAP) and renal (RBF, RVR) vasoreactivity to 0.25 to 2 ng angiotensin II (Sigma Aldrich, Saint-Louis, United States) or 20 ng norepinephrine (Mylan, Canonsburg, United States) was evaluated before and after hDPP3 or procizumab administration.

### *Biochemical measurements*

Biochemical measurements were performed during separate experiments to avoid any perturbation of hemodynamic measurements due to the loss of circulating blood volume. Blood samples were taken from mice anesthetized by ketamine and buprenorphine at different timepoints after hDPP3, PCZ or PBS injection. Blood was collected on ice in pre-labeled tubes loaded with an angiotensin-stabilizing protease inhibitor cocktail, lithium heparin, or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Particular attention was paid to the brevity of the

sampling procedure, which lasted less than 60 seconds. Tubes containing blood were inverted 5 times to allow homogenous mixture of respective contents prior to centrifugation at 2000g for 10min at 4°C. Supernatant plasma was collected in pre-labeled aliquots and flash frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C for further analyses.

DPP3 activity was measured in heparin plasma samples using a soluble activity assay as previously described (2).

Circulating angiotensins concentrations were determined by mass spectrometry using heparin plasma samples collected in the presence of an inhibitor cocktail completely blocking the degradation of angiotensin peptides. The inhibitor cocktail contained broad spectrum inhibitors against metalloproteases (EDTA, 1,10-phenanthroline), aspartic proteases (pepstatin A), cysteine proteases (p-hydroxymercuribenzoic acid), serine proteases (AEBSF), and specific inhibitors for renin and aminopeptidases A and N to a final concentration of 5% v/v (Attoquant Diagnostics, Vienna, Austria) (17).

Circulating epinephrine, norepinephrine and dopamine were measured after specific EDTA plasma sample preparation through solid phase extraction (Chromsystems Instruments, Gräfelfing, Germany), using an isocratic high performance liquid chromatography system with electrochemical detection (Coularray®, ESA, Chelmsford, United States).

Plasma creatinine, urea and total proteins were measured on an automatic analyzer (Konelab 20i, Thermo, Cergy, France), sodium was assessed by flame spectrophotometry (Sherwood Scientific, Cambridge, United Kingdom) and plasma osmolality was measured using the freezing point depression method with a Löser type 15 osmometer (Löser Messtechnik, Berlin, Germany).

#### *Estimation of glomerular filtration rate*

Glomerular filtration rate was estimated by measuring the transcutaneous clearance of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled sinistrin, as previously described (18).

#### *Statistical analyses*

All statistical analyses and graphs were made using the GraphPad Prism software version 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). The normality of distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test and variables were expressed as means  $\pm$  SE or median and interquartile range as appropriate.

Hemodynamic changes induced by PBS, hDPP3 or PCZ administration were analyzed relative to baseline values. Longitudinal data were analyzed by repeated-measure ANOVA followed by

post-hoc Dunnett's multiple comparison test. Intergroup data at a specific timepoint were analyzed using ANOVA or the Kruskal-Wallis test as appropriate, followed by post-hoc Dunnett's multiple comparison test or Dunn's test. Correlations were evaluated by the Pearson correlation coefficient ( $r$ ). All tests were two-sided and a  $p$ -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *DPP3 modulates hemodynamics and vascular reactivity to angiotensin II.*

To assess the effect of DPP3 on blood pressure and renal hemodynamics, hDPP3 was intravenously injected to isoflurane-anaesthetized mice (**Figure 1, Supplemental table E1**). Compared to PBS-injected mice, hDPP3-injected mice exhibited a transient and massive increase of RBF (**Figure 1B**), while MAP remained constant (**Figure 1A**), reflecting decreased RVR (**Figure 1C**). The maximal effect of a single bolus injection of hDPP3 was reached within ~1 min and lasted 15 to 30 min. Conversely, PCZ administration produced a progressive, significant reduction of RBF without change in MAP, thus reflecting increased RVR.

As angiotensin II has been suggested to be a substrate of DPP3, we next investigated whether hDPP3 or PCZ affects systemic or renal vasoreactivity to angiotensin II. Prior to hDPP3 injection, repeated intravenous bolus of increasing doses of angiotensin II induced a dose-dependent increase in MAP concomitantly with a dose-dependent decrease in RBF reflecting increased RVR (ANOVA, dose effect  $p < 0.05$  for all three variables) (**Figure 2**). The maximal response was reached within ~25s, independent of the dose. After hDPP3 administration, the systemic (MAP) and renal (RBF, RVR) vasoreactivity to angiotensin II was systematically decreased ( $p < 0.01$  for all three variables) (**Figure 2, Supplemental Figure E1**). In contrast, hDPP3 administration did not affect the vasoconstrictive effect of norepinephrine, a vasopressor which metabolism is DPP3-independent (**Supplemental Figure E2**). Conversely, PCZ administration did not affect the systemic or renal vasoreactivity of angiotensin II (**Figure 2, Supplemental Figure E1**).

### *DPP3 modulates the RAS in vivo.*

To confirm that hDPP3 induces angiotensins cleavage in vivo, circulating concentrations of angiotensins metabolites were measured on stabilized plasma sampled 15 and 60min after hDPP3, PBS or PCZ injections to anesthetized mice. Compared to PBS-injected animals, hDPP3 administration was associated with increased circulating angiotensin I and decreased

concentrations of angiotensin II, III and IV, 15min after injection. Conversely, PCZ administration led to increased circulating concentrations of angiotensin II and (1-5) (**figure 3**). The effect of hDPP3 but not PCZ on circulating angiotensin concentrations persisted at least for 60 min after injection (**Supplemental Figure E3**).

*The renovascular effect of hDPP3 implicates decreased angiotensin type 1 receptor agonism.*

We next investigated whether the renovascular effect observed after hDPP3 administration is due to angiotensin cleavage. Thus, mice were pretreated with valsartan, an AT1R antagonist. As expected, pre-treatment with valsartan decreased MAP (-12%, from  $89 \pm 5$  to  $78 \pm 5$  mmHg,  $p=0.001$ ), increased RBF (+71%, from  $0.70 \pm 0.12$  to  $1.2 \pm 0.34$  mL.min<sup>-1</sup>,  $p=0.0215$ ), reflecting decreased RVR (-41%, from  $121 \pm 26$  to  $72 \pm 24$  mmHg.mL<sup>-1</sup>.min,  $p=0.0125$ ). Because these hemodynamic effects were transient, only the maximum response to subsequent hDPP3 administration, measured at 1min after injection, was analyzed. Compared to untreated mice, valsartan-pretreated mice exhibited decreased responses to hDPP3 (**figure 4**, **Supplemental Figure E4**). Notably, the renovascular hemodynamic response to valsartan, as well as to the subsequent injection of hDPP3, displayed important inter-individual variability. Nevertheless, we observed a strong negative correlation between the effect induced by valsartan on RBF and the added effect of subsequent hDPP3 injection, suggesting that the more efficient AT1R blockade is, the less additive hDPP3 effect is observed (RBF,  $r=-0.959$ ,  $p=0.0025$ ; RVR,  $r=-0.923$ ,  $p=0.0085$ ). Administration of a higher dose of valsartan to ensure complete AT1R blockade was not possible due to poor tolerance. In contrast, a pretreatment by the pan-opioid receptor antagonist naloxone produced a marginal hemodynamic effect (MAP, -4%, from  $93 \pm 9$  to  $89 \pm 6$  mmHg,  $p=0.19$ ; RBF, +11%, from  $0.61 \pm 0.068$  to  $0.68 \pm 0.081$  mL.min<sup>-1</sup>,  $p=0.0442$ ; RVR, -14%, from  $155 \pm 18$  to  $134 \pm 14$  mmHg.mL<sup>-1</sup>.min,  $p=0.10$ ) and did not alter the response to subsequent hDPP3 administration (**Supplemental Figure E5**). Taken together, these data suggest that hDPP3 mediates its effect on renal hemodynamics through decreased AT1R signaling.

*hDPP3 injection do not alter renal function in mice.*

To investigate the effect of hDPP3 or PCZ injection on glomerular function, water, and sodium homeostasis, we measured creatinine, urea, sodium, osmolality, and total plasma proteins on samples taken 24h after injection. Compared to PBS-injected mice, neither hDPP3 nor PCZ produced significant changes on any of these variables (**Supplemental Table E2**).

To further investigate a potential transient effect of hDPP3 or PCZ on renal function, we estimated glomerular filtration rate using transcutaneous measurement of FITC-sinistrin clearance. The estimated GFR measured in the 90min following PBS, hDPP3 or PCZ injection did not differ significantly between the groups (**Supplemental Figure E6**).

#### *DPP3-induced catecholamines release maintains blood pressure.*

To explain the maintenance of a stable blood pressure upon hDPP3 administration, we tested whether a compensatory response was involved to counteract the loss of systemic vasoconstrictive effect associated to excessive angiotensin II cleavage. To address this question, we measured the concentrations of circulating endogenous catecholamines, namely epinephrine, norepinephrine, and dopamine at different timepoints (5, 15 and 60min) after PBS, hDPP3 or PCZ administration. Compared to the PBS-injected group, mice injected with hDPP3 exhibited a progressive release of catecholamines, reaching maximal concentrations at 60 min while the PCZ group showed a tendency for the opposite effect (table 1). To confirm that catecholamine release prevents the decrease of blood pressure after hDPP3 injection, we pretreated mice with the alpha- and beta-adrenergic receptor blocker labetalol, before hDPP3 administration. As expected, labetalol pretreatment induced a sustained decrease of MAP (-13%, from  $84 \pm 6$  to  $73 \pm 3$  mmHg,  $p=0.0224$ ), without significant changes of RBF (-7%, from  $0.71 \pm 0.064$  to  $0.66 \pm 0.13$  mL.min<sup>-1</sup>,  $p=0.36$ ) nor RVR (-2%, from  $121 \pm 9$  to  $118 \pm 26$  mmHg.mL<sup>-1</sup>.min,  $p=0.75$ ). Upon hDPP3 administration, an abrupt fall of blood pressure was observed in labetalol-pretreated mice, contrasting with untreated mice. Additionally, pretreatment by labetalol was associated with enhanced hDPP3 effects on renal hemodynamics (**figure 5**). Taken together, these findings confirm that endogenous catecholamine release compensates for the hemodynamic changes induced by DPP3-mediated cleavage of angiotensins.

#### **Discussion**

In the present work, we show that hDPP3 administration to healthy mice decreases renovascular resistance leading to increased renal blood flow, while blood pressure is minimally affected. Additionally, hDPP3 administration is associated with decreased systemic and renal vasoreactivity to angiotensin II. We demonstrate that the renovascular effect induced by hDPP3 is due to reduced AT1R activation via decreased concentrations of circulating angiotensin II, III, IV. An additional novel finding is that hDPP3 administration is associated with catecholamines release which maintain blood pressure despite decreased concentration of vasoconstrictive angiotensins.

As angiotensin II is the main circulating AT1R agonist due to its relative abundance and its maximal receptor affinity, it is likely that the hemodynamic changes observed in our experiments primarily reflect DPP3-mediated angiotensin II cleavage. Nevertheless, as angiotensin III and IV also have some affinity for the AT1R receptor, decreased concentrations of these peptides upon hDPP3 administration could also play a minor role (19). Our data show clearly that DPP3 can cleave angiotensin II in vivo while most previous works have identified potential DPP3 substrates based on in vitro or ex-vivo experiments. To our knowledge, only one study investigated angiotensin II cleavage in vivo in an experimental setting where exogenous angiotensin II was administered to artificially induce hypertension(20). Interestingly, in the latter study, DPP3 administration reduced blood pressure in angiotensin II-infused hypertensive mice while it did not affect hemodynamics in norepinephrine-induced hypertensive mice nor normotensive mice. These results as well as ours establish that the action of DPP3 on blood pressure is mediated via the cleavage of angiotensin II and becomes apparent when systemic hemodynamics are in a state of dependence toward angiotensin II. Moreover, we show that the effect of DPP3 on renal hemodynamics, caused by decreased stimulation of AT1R, was consistent with the known vasoactive properties of angiotensin II. In the absence of angiotensin II-AT1R signaling as observed during treatment with the AT1R antagonist valsartan, the decrease in total RVR induces an increase of RBF. As angiotensin II tends to exert a preferential, but not exclusive, vasoconstrictor effect on the efferent glomerular arteriole, loss of AT1R-dependent tone tends to decrease glomerular filtration pressure, and thus glomerular filtration rate (21–23). However, isolated loss of AT1R tone such as induced by short-term pharmacological blockade in young, healthy, sodium-repleted animals or humans appear insufficient to induce significant changes of glomerular filtration rate (24, 25). Thus, the lack of short-term alteration of GFR in our experiments could be related to the brevity of the hemodynamic modifications induced by a single bolus of hDPP3 and/or the integrity of endogenous mechanisms compensating for the isolated loss of AT1R tone.

Our data demonstrate that inhibition of physiological cDPP3 activity by PCZ in mice is associated with significant biochemical (increased angiotensin II concentration) and hemodynamic (decreased RBF) changes, thus proving that cDPP3 activity is of significance concerning angiotensin metabolism, even in physiological conditions. The small amplitude of PCZ-induced hemodynamic changes could be related to the overall low sensitivity of mice to angiotensin II, to the incomplete inhibition of cDPP3 activity by PCZ or because of the low

baseline cDPP3 activity of healthy mice. A more pronounced effect could be observed in a pathological condition where cDPP3 is elevated and/or the RAS activated. From a therapeutic perspective, it is interesting to note that the inhibition of cDPP3 by PCZ is not associated with major hemodynamic changes when cDPP3 is low.

Our results could have multiple implications:

We have demonstrated that DPP3 cleaves angiotensin II *in vivo*, providing arguments to the view that high cDPP3 can contribute to the recently reported RAS alterations during shock (11, 13, 26). Furthermore, the finding that DPP3 is associated with a decreased systemic and renal vasoreactivity to angiotensin II questions the relevance of administering angiotensin II in situations where cDPP3 is high. Indeed, high cDPP3 could explain why some patients have a poor hemodynamic response to angiotensin II (27, 28). In such situations, inhibition of cDPP3 activity could improve hemodynamic by increasing endogenous angiotensin II concentration and/or restore exogenous angiotensin II sensitivity.

Furthermore, the administration of hDPP3 to mice had a minimal effect on blood pressure, due to a compensatory release of endogenous catecholamines. In a pathological condition, where sympathetic stimulation is often already maximal, DPP3 release could be associated with further decrease of blood pressure. Alternatively, blood pressure could be maintained further stimulating catecholamine release and thus at a cost of potential undesirable effects: increased myocardial oxygen consumption, increased risk of cardiac arrhythmia, immunosuppression and enhanced bacterial growth (29–32). Inversely, inhibition of cDPP3 activity could be an interesting strategy aiming at an effective decatecholaminisation during circulatory failure (33). Further work is needed to determine whether the modulation of catecholamine release is purely compensatory or relies on more specific mechanisms involving DPP3 substrates.

Finally, it is interesting to note that the effects of DPP3 on renal hemodynamics are due to reduced AT1R activation via angiotensins cleavage. In our experimental setting, the DPP3-induced hemodynamic changes did not affect renal function (GFR). However, the case can be completely different under pathological conditions where the elevation of cDPP3 is sustained, and several regulatory mechanisms are altered. Indeed, it has been demonstrated that RAS alterations during septic shock are associated with a high-RBF acute kidney injury (12, 34). In such situations, cDPP3 inhibition can lead to both improved renal hemodynamics and function.

Our study also has some limitations.

First, our experiments were limited to exploring the role of cDPP3 in otherwise healthy animals. The current design allows for a clean investigation of the mode of action of DPP3 and PCZ without the complex multifactorial effects of acute circulatory failure. Future studies should focus on more complex pathological models.

Second, only mice models were used in our study. Future studies on large animal models could allow a more detailed characterization of the macro- and micro-circulatory effects of cDPP3 and its inhibition.

Finally, if our work excludes a role of endogenous opioids in the hemodynamic changes observed, a potential role of known (angiotensins, enkephalins or endomorphins) or still unknown DPP3 substrates on other endpoints is not completely excluded. Further work may focus on identifying these substrates and their specific effects.

In conclusion, our study demonstrates that hDPP3 administration to mice induces a transient drop in RVR caused by enhanced degradation of angiotensin II leading to increased RBF whereas blood pressure is maintained by means of increased circulating endogenous catecholamines. These findings strengthen the fact that cDPP3 is an actor of circulatory failure and contributes to RAS alterations and associated consequences in shock.

### **Perspectives**

Our work highlights the importance of circulating DPP3 in angiotensins metabolism and suggests a mechanism explaining the poor prognosis associated with high cDPP3 in critically ill patients. Additionally, relevant biochemical (circulating angiotensins and catecholamines) and clinical (blood pressure, renal hemodynamics and function) endpoints could be used in future experimental and/or clinical studies dedicated to the role of circulating dipeptidyl peptidase 3 in pathological conditions. In such conditions, further work could focus on the mechanisms of DPP3 release into the circulation. Finally, this study suggests that excessive angiotensins degradation by high circulating DPP3 during circulatory failure could be targeted by procizumab.

## **Novelty and Relevance:**

### What Is New?

- In mice, dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) administration increases renal blood flow while an anti-DPP3 antibody induces opposite effects.
- The renovascular effect of DPP3 reflects decreased AT1R activation via angiotensins cleavage.
- Endogenous catecholamine release explains blood pressure maintenance upon DPP3 administration.

### What Is Relevant?

- DPP3 cleaves endogenous angiotensins.

### Clinical/Pathophysiological Implications?

- In critically ill patients, high circulating DPP3 associates with severe cardiovascular and renal failures, and poor survival.
- These findings suggest that high circulating DPP3 contributes to inadequately low angiotensin II concentration and associated consequences in shock.

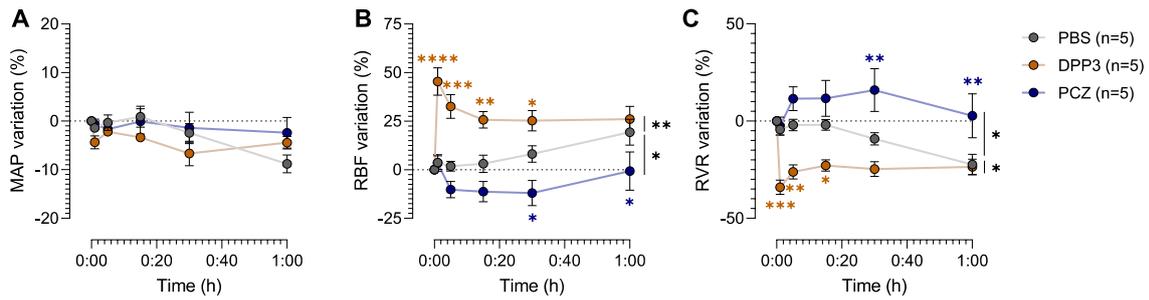
## References

1. Deniau B, Picod A, Van Lier D, Vaittinada Ayar P, Santos K, Hartmann O, et al. High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort. *Br J Anaesth* 2022;128:e54–e57.
2. 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* 2020;22:290–299.
3. Takagi K, Blet A, Levy B, Deniau B, Azibani F, Feliot E, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial. *Eur J Heart Fail* 2020;22:279–286.
4. Blet A, Deniau B, Santos K, van Lier DPT, Azibani F, Wittebole X, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit Care Lond Engl* 2021;25:61.
5. 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 Lond Engl* 2020;24:168.
6. van Lier D, Picod A, Marx G, Laterre P-F, Hartmann O, Knothe C, et al. Effects of enrichment strategies on outcome of adrenergic treatment in septic shock: Post-hoc analyses of the phase II adrenomedullin and outcome in septic shock 2 trial. *Front Med* 2022;9:1058235.
7. Lee CM, Snyder SH. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J Biol Chem* 1982;257:12043–12050.
8. 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;388:343–348.
9. 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;295:13711–13723.
10. Rehfeld L, Funk E, Jha S, Macheroux P, Melander O, Bergmann A. Novel Methods for the Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples. *J Appl Lab Med* 2019;3:943–953.
11. 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. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;doi:10.1164/rccm.201911-2172OC.

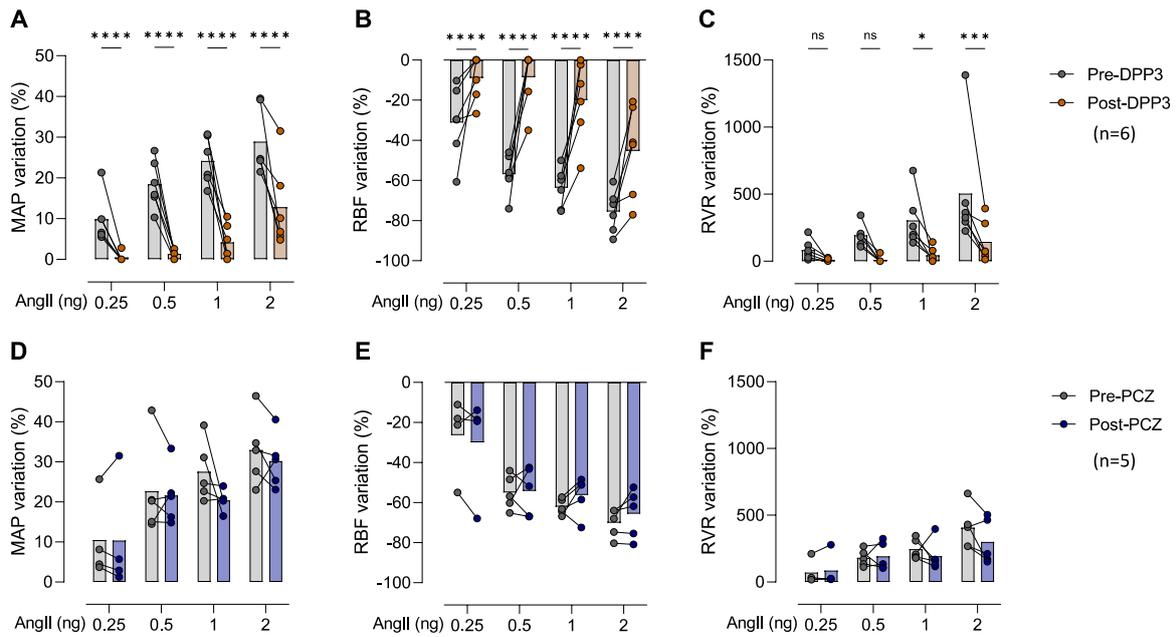
12. Leisman DE, Fernandes TD, Bijol V, Abraham MN, Lehman JR, Taylor MD, et al. Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2020;doi:10.1016/j.kint.2020.07.047.
13. Picod A, Deniau B, Vaittinada Ayar P, Genest M, Julian N, Azibani F, et al. Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:526–527.
14. 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:e0238039.
15. Kaufmann P, Muenzner M, Kästorf M, Santos K, Hartmann T, Dienelt A, et al. A novel and highly efficient purification procedure for native human dipeptidyl peptidase 3 from human blood cell lysate. *PloS One* 2019;14:e0220866.
16. Boffa J-J, Just A, Coffman TM, Arendshorst WJ. Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. *J Am Soc Nephrol JASN* 2004;15:2358–2365.
17. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Pharmacodynamic effects of C-domain-specific ACE inhibitors on the renin-angiotensin system in myocardial infarcted rats. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS* 2015;16:1149–1158.
18. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303:F783-788.
19. Yang R, Smolders I, Dupont AG. Blood pressure and renal hemodynamic effects of angiotensin fragments. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* 2011;34:674–683.
20. 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.
21. Dávalos M, Frega NS, Saker B, Leaf A. Effect of exogenous and endogenous angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1978;235:F605-610.
22. Kastner PR, Hall JE, Guyton AC. Control of glomerular filtration rate: role of intrarenally formed angiotensin II. *Am J Physiol* 1984;246:F897-906.
23. Denton KM, Anderson WP, Sinniah R. Effects of angiotensin II on regional afferent and efferent arteriole dimensions and the glomerular pole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R629-638.

24. Schnermann J, Huang YG, Briggs JP. Angiotensin II blockade causes acute renal failure in eNOS-deficient mice. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS* 2001;2:S199–S203.
25. Burnier M, Hagman M, Nussberger J, Biollaz J, Armagnac C, Brouard R, et al. Short-term and sustained renal effects of angiotensin II receptor blockade in healthy subjects. *Hypertens Dallas Tex* 1979 1995;25:602–609.
26. Bellomo R, Wunderink RG, Szerlip H, English SW, Busse LW, Deane AM, et al. Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. *Crit Care Lond Engl* 2020;24:43.
27. Khanna A, English SW, Wang XS, Ham K, Tumlin J, Szerlip H, et al. Angiotensin II for the Treatment of Vasodilatory Shock. *N Engl J Med* 2017;377:419–430.
28. Ham KR, Boldt DW, McCurdy MT, Busse LW, Favory R, Gong MN, et al. Sensitivity to angiotensin II dose in patients with vasodilatory shock: a prespecified analysis of the ATHOS-3 trial. *Ann Intensive Care* 2019;9:63.
29. Lyte M, Freestone PPE, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, et al. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet Lond Engl* 2003;361:130–135.
30. 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;202:830–842.
31. Wieruszewski ED, Jones GM, Samarin MJ, Kimmons LA. Predictors of dysrhythmias with norepinephrine use in septic shock. *J Crit Care* 2021;61:133–137.
32. Durand M, Hagimont E, Louis H, Asfar P, Fripiat J-P, Singer M, et al. The  $\beta$  1 -Adrenergic Receptor Contributes to Sepsis-Induced Immunosuppression Through Modulation of Regulatory T-Cell Inhibitory Function. *Crit Care Med* 2022;50:e707–e718.
33. Rudiger A, Singer M. Decatecholaminisation during sepsis. *Crit Care Lond Engl* 2016;20:309.
34. Wan L, Langenberg C, Bellomo R, May CN. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit Care Lond Engl* 2009;13:R190.

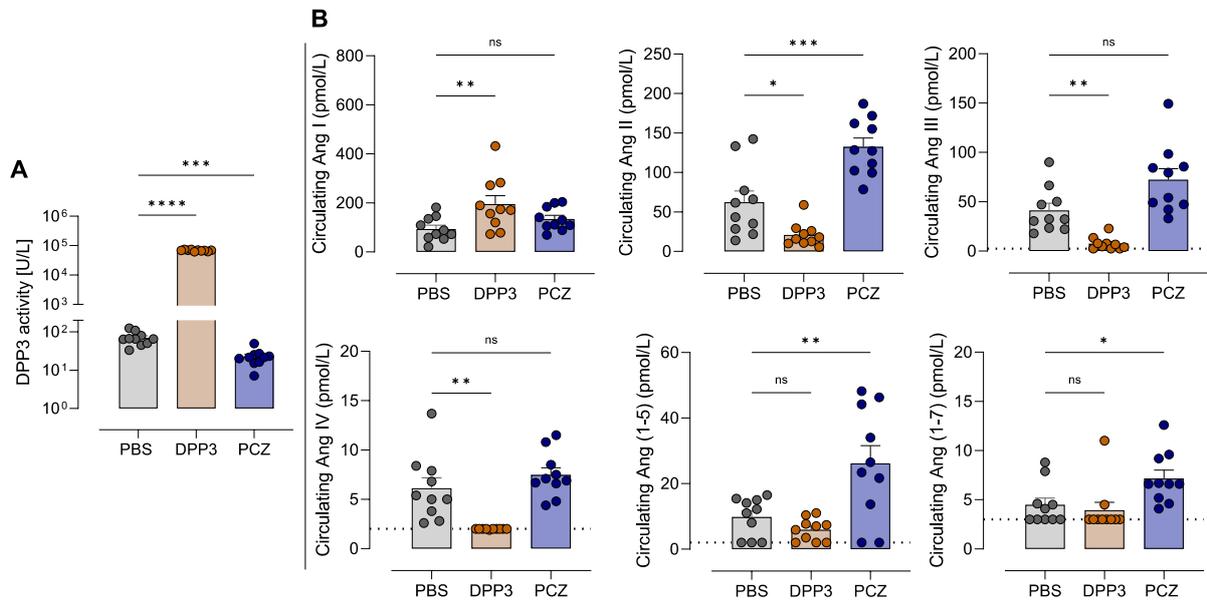
## Figures



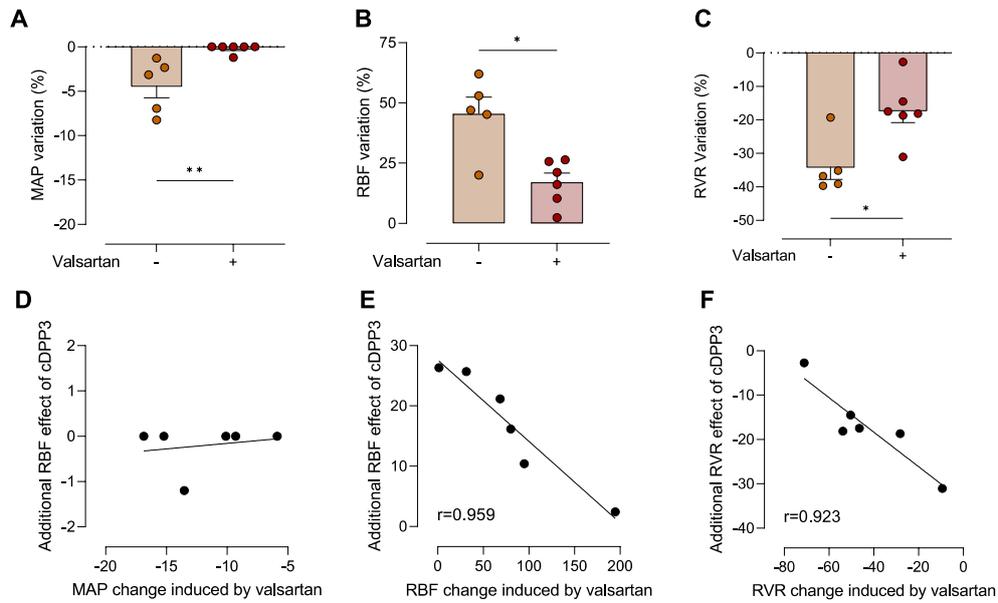
**Figure 1.** Effect of dipeptidyl peptidase 3 or procizumab injection on systemic and renal hemodynamics: mean arterial pressure (A), renal blood flow (B) and renovascular resistances variations after DPP3, PBS or PCZ administration. Data are presented as mean  $\pm$  SE. Comparison between group was made by repeated-measure ANOVA followed by post-hoc Dunnett's multiple comparison test. DPP3: dipeptidyl peptidase 3, PBS: phosphate buffered saline, PCZ: procizumab, MAP: mean arterial pressure, RBF: renal blood flow, RVR: renovascular resistances.



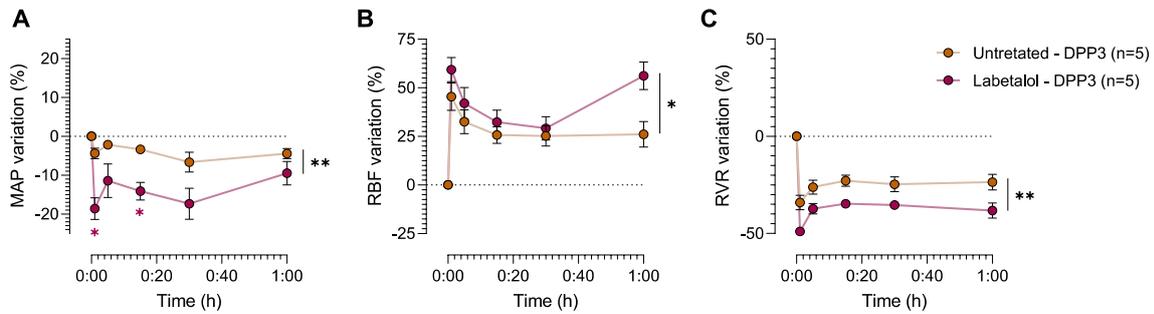
**Figure 2.** Effect of DPP3 and PCZ on systemic and renal vasoreactivity to angiotensin II. Effect of DPP3 on the peak MAP (A), RBF (B) and RVR (C) of increasing doses of angiotensin II. Effect of PCZ on the peak MAP (D), RBF (E) and RVR (F) of increasing doses of angiotensin II. Comparison between group was made ANOVA. MAP: mean arterial pressure, RBF: renal blood flow, RVR: Renovascular resistance. AngII: angiotensin II, DPP3: dipeptidyl peptidase 3. PCZ: procizumab.



**Figure 3:** DPP3 activity and circulating angiotensins 15 min after PBS, DPP3 or PCZ administration. Comparison between group was made by ANOVA or the Kruskal-Wallis test as appropriate (n=10 per group). Ang: Angiotensin, DPP3: dipeptidyl peptidase 3. PCZ: procizumab.



**Figure 4.** Effects of a pretreatment by valsartan on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3: maximal effect (T+1min) on mean arterial pressure (A), renal blood flow (B) and renovascular resistances (C) variations after DPP3 in mice pretreated (n=6) or not (n=5) with the AT1R antagonist valsartan. Correlation between the effect induced by valsartan and the additional effect produced by DPP3 administration on mean arterial pressure (D), renal blood flow (E) and renovascular resistances (F). Data are presented as mean +/- SE. DPP3: dipeptidyl peptidase 3, MAP: mean arterial pressure, RBF: renal blood flow, RVR: renovascular resistances.



**Figure 5:** Effects of a pretreatment by labetalol on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3: mean arterial pressure (A), renal blood flow (B) and renovascular resistances variations after DPP3 in mice pretreated (n=5) or not (n=5) with the  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors antagonist labetalol. Data are presented as mean  $\pm$  SE. Comparison between group was made by repeated-measure ANOVA followed by post-hoc Dunnett's multiple comparison test. DPP3: dipeptidyl peptidase 3, MAP: mean arterial pressure, RBF: renal blood flow, RVR: renovascular resistances.

	PBS	DPP3	PCZ	p
<b>Norepinephrine (pmol/L)</b>				
T5	10321 ± 2402	12342 ± 2331	8734 ± 2392	<b>0,008</b>
T15	10800 ± 2221	10378 ± 2863	7327 ± 2953 *	<b>0,0201</b>
T60	9411 ± 1352	17744 ± 3993 ***	7500 ± 1094 **	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Epinephrine (pmol/L)</b>				
T5	1503 ± 485,2	1961 ± 494,9	1195 ± 282,4	<b>0,0035</b>
T15	1349 ± 575,7	2436 ± 824,1	873,2 ± 223,0	<b>0,0002</b>
T60	1282 ± 174,8	3325 ± 1337 *	765,4 ± 152,3 *	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Dopamine (pmol/L)</b>				
T5	2484 ± 519,3	2718 ± 683,4	2471 ± 586,1	0,5916
T15	1961 ± 723,3	2624 ± 698,8	1780 ± 352,8	<b>0,0122</b>
T60	1720 ± 505,1	2834 ± 596,5 ****	1234 ± 250,8	<b>&lt;0,0001</b>

**Table 1.** Circulating catecholamines concentrations at 5, 15, and 60 min after PBS, DPP3 or PCZ administration. Comparison were made using ANOVA or the Kruskal-Wallis test. Post-hoc comparisons with PBS group: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001 in comparison with the PBS group at the same timepoint. N= 10 per group at each timepoint.

## **Circulating dipeptidyl peptidase 3 modulates systemic and renal hemodynamics through angiotensins cleavage**

Adrien Picod, Sandrine Placier, Magali Genest, Jacques Callebert, Nathan Julian, Maxime Zalc, Noma Assad, Karine Santos, Stéphane Gaudry, Christos Chatziantoniou, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani

### **Online Data Supplement**

**Supplemental figure E1:** Duration of systemic and renal effect of DPP3 and PCZ.

**Supplemental figure E2.** Effect of DPP3 and PCZ on systemic and renal vasoreactivity to norepinephrine.

**Supplemental figure E3:** DPP3 activity and circulating angiotensins 60 min after PBS, DPP3 or PCZ administration.

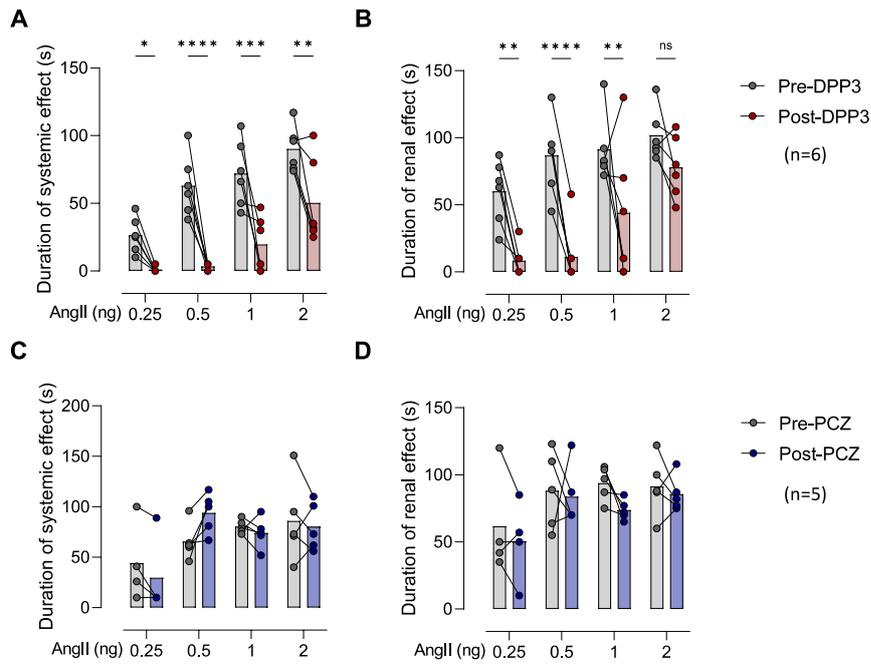
**Supplemental figure E4:** Effects of a pretreatment by valsartan on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3.

**Supplemental figure E5.** Effects of a pretreatment by naloxone on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3.

**Supplemental figure E6:** Estimated glomerular filtration rate following PBS, hDPP3 or PCZ administration mice measured by the transcutaneous FITC-sinistrine clearance technique.

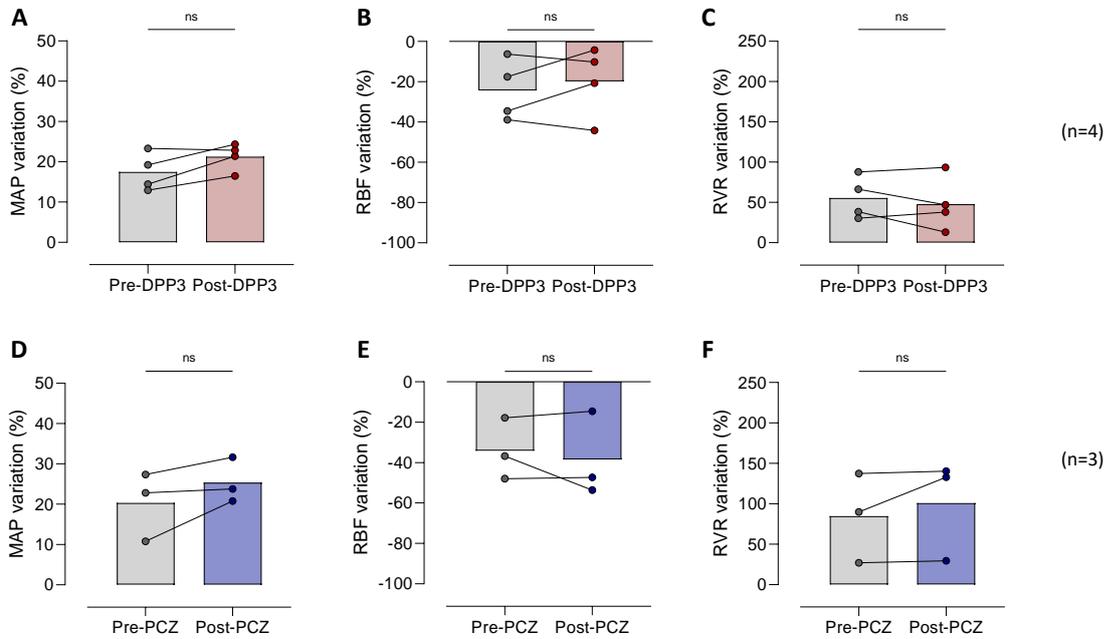
**Supplemental table E1.** Effects of dipeptidyl peptidase 3 or procizumab injection on systemic and renal hemodynamics.

**Supplemental table E2.** Markers of renal function and sodium and water homeostasis 24 hours after PBS, DPP3 or PCZ administration.

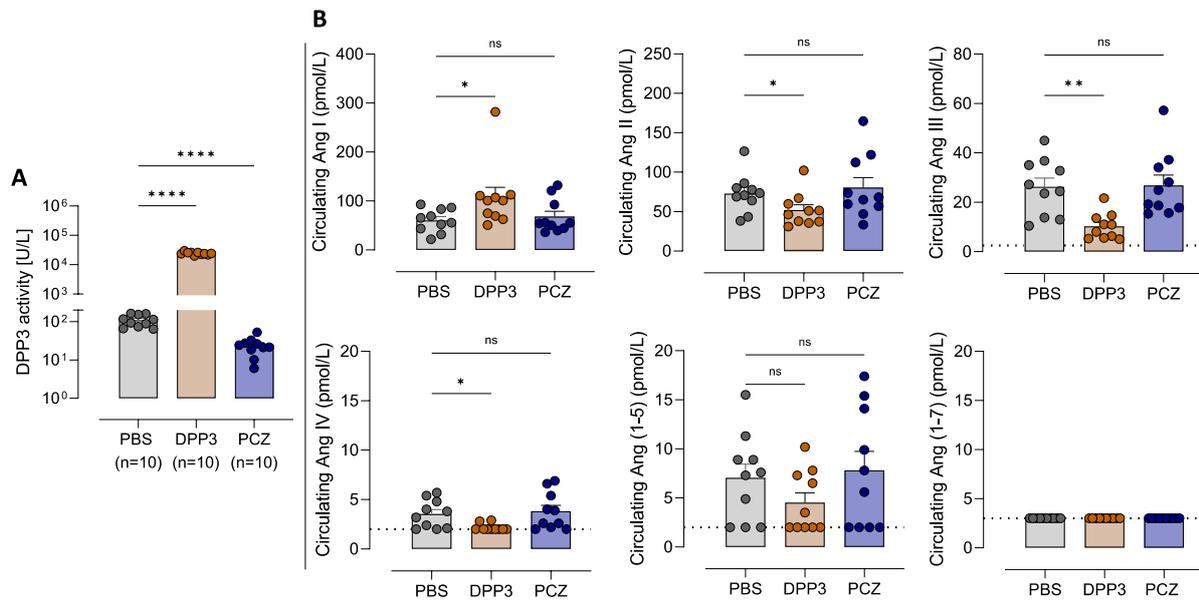


**Supplemental figure E1:** Duration of systemic and renal effect of DPP3 (A,B) and PCZ (C,D).

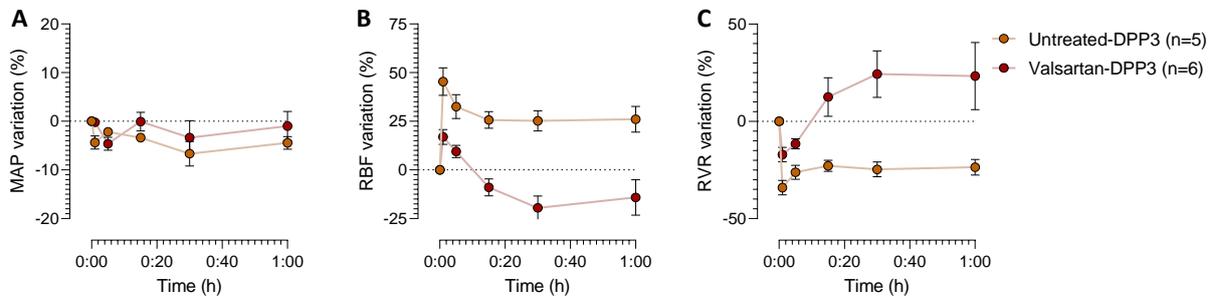
Comparison between group was made ANOVA. MAP: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: Renovascular resistance. AngII: Angiotensin II, DPP3: Dipeptidyl peptidase 3. PCZ: Procizumab.



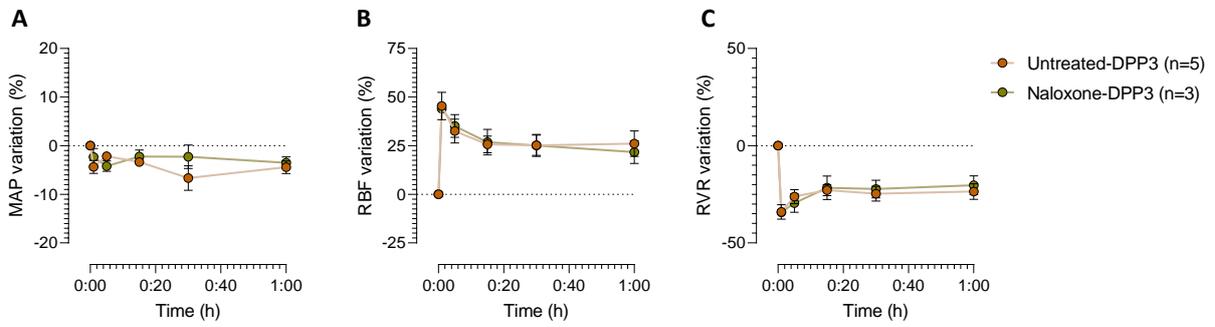
**Supplemental figure E2.** Effect of DPP3 and PCZ on systemic and renal vasoreactivity to norepinephrine. Effect of DPP3 on the peak MAP (A), RBF (B) and RVR (C) of 20 ng of norepinephrine. Effect of DPP3 on the peak MAP (D), RBF (E) and RVR (F) of 20 ng of norepinephrine. MAP: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: Renovascular resistance. DPP3: Dipeptidyl peptidase 3. PCZ: Procizumab.



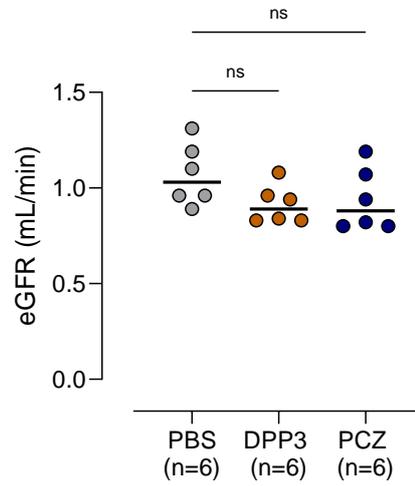
**Supplemental figure E3:** DPP3 activity and circulating angiotensins 60 min after PBS, DPP3 or PCZ administration. Comparison between group was made ANOVA or the Kruskal-Wallis test as appropriate (n=10 *per* group). Ang: Angiotensin, DPP3: Dipeptidyl peptidase 3. PCZ: Procizumab.



**Supplemental figure E4:** Effects of a pretreatment by valsartan on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3: mean arterial pressure (A), renal blood flow (B) and renovascular resistances variations after DPP3 in mice pretreated or not with the AT1R antagonist valsartan. Data are presented as mean  $\pm$  SE. DPP3: Dipeptidyl peptidase 3, MAP: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: renovascular resistances.



**Supplemental figure E5.** Effects of a pretreatment by naloxone on the systemic and renal hemodynamic effects induced by DPP3: mean arterial pressure (A), renal blood flow (B) and renovascular resistances variations after DPP3 in mice pretreated or not with the pan-opioid receptors antagonist naloxone. Data are presented as mean  $\pm$  SE. DPP3: Dipeptidyl peptidase 3, MAP: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: renovascular resistances.



**Supplemental figure E6:** Estimated glomerular filtration rate following PBS, hDPP3 or PCZ administration mice measured by the transcutaneous FITC-sinistrine clearance technique. Comparison between group was made by ANOVA. eGFR: estimated glomerular filtration rate, DPP3: Dipeptidyl peptidase 3, PBS: Phosphate buffered saline, PCZ: Procizumab, MPA: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: renovascular resistances.

Group	PBS (n=5)	DPP3 (n=5)	PCZ (n=5)	p
	Absolute mean ± SD (Relative mean ± SD)	Absolute mean ± SD (Relative mean ± SD)	Absolute mean ± SD (Relative mean ± SD)	ANOVA, group effect
<b>Mean arterial pressure (mmHg)</b>				<b>0.33</b>
T0 (baseline)	87 ± 5	89 ± 9	85 ± 3	
T5min	86 ± 5 (-1.4 ± 1.9)	85 ± 8 (-4.4 ± 0.0)	85 ± 3 (-0.7 ± 2.5)	
T5min	87 ± 7 (-0.3 ± 3.6)	87 ± 8 (-2.2 ± 0.0)	84 ± 3 (-1.6 ± 2.1)	
T15min	88 ± 6 (0.9 ± 4.8)	86 ± 9 (-3.3 ± 0.0)	85 ± 6 (0 ± 5.8)	
T30min	85 ± 7 (-2.4 ± 4.3)	84 ± 12 (-6.6 ± 0.1)	84 ± 6 (-1.4 ± 7.2)	
T60min	80 ± 7 (-8.8 ± 4.0)	86 ± 11 (-4.4 ± 0.0)	83 ± 7 (-2.4 ± 7.0)	
<b>Renal blood flow (mL/min)</b>				<b>&lt;0.0001</b>
T0 (baseline)	0.805 ± 0.20	0.832 ± 0.21	0.712 ± 0.04	
T5min	0.824 ± 0.15 (3.6 ± 8.0)	1.218 ± 0.37 (45.4 ± 15.6)	0.736 ± 0.07 (3.5 ± 9.5)	
T5min	0.814 ± 0.17 (1.8 ± 5.7)	1.104 ± 0.30 (32.6 ± 13.7)	0.64 ± 0.08 (-10.3 ± 9.4)	
T15min	0.815 ± 0.13 (3.1 ± 9.9)	1.058 ± 0.34 (25.7 ± 9.6)	0.634 ± 0.10 (-11.3 ± 11.6)	
T30min	0.855 ± 0.13 (8.1 ± 9.7)	1.06 ± 0.38 (25.2 ± 11.8)	0.628 ± 0.12 (-12.01 ± 14.6)	
T60min	0.947 ± 0.18 (19.3 ± 14.9)	1.048 ± 0.27 (26.0 ± 14.8)	0.706 ± 0.15 (-0.74 ± 21.9)	
<b>Renovascular resistances (mmHg.mL-1.min)</b>				<b>0.0002</b>
T0 (baseline)	114 ± 27	112 ± 20	123 ± 10	
T5min	108 ± 22 (-4.4 ± 6.5)	75 ± 22 (-34.0 ± 8.4)	119 ± 12 (-2.6 ± 10.3)	
T5min	111 ± 27 (-2.2 ± 6.6)	83 ± 21 (-26.1 ± 8.1)	137 ± 21 (11.5 ± 13.8)	
T15min	111 ± 21 (-1.9 ± 6.2)	87 ± 22 (-22.8 ± 6.5)	139 ± 38 (11.7 ± 20.8)	
T30min	102 ± 18 (-9.1 ± 7.1)	85 ± 24 (-24.7 ± 8.6)	143 ± 35 (15.9 ± 24.8)	
T60min	88 ± 23 (-22.4 ± 11.9)	86 ± 20 (-23.5 ± 9.0)	126 ± 33 (2.8 ± 25.3)	

**Supplemental table E1.** Effects of dipeptidyl peptidase 3 or procizumab injection on systemic and renal hemodynamics. DPP3: Dipeptidyl peptidase 3, PBS: Phosphate buffered saline, PCZ: Procizumab, MAP: Mean arterial pressure, RBF: Renal blood flow, RVR: renovascular resistances. Data are presented as mean +/- SD.

	PBS (n=10)	DPP3 (n=10)	PCZ (n=10)	p
<b>Creatinine (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	8.1 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 0.5	0.93
<b>Urea (mmol/L)</b>	7.3 $\pm$ 1.1	7.6 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.6	0.39
<b>Sodium (mmol/L)</b>	146.5 $\pm$ 3.5	148.3 $\pm$ 3.0	146.1 $\pm$ 5.4	0.48
<b>Osmolality (mOsm/kg H<sub>2</sub>O)</b>	303.2 $\pm$ 9.1	304.4 $\pm$ 5.7	299.2 $\pm$ 7.8	0.30
<b>Total proteins (g/L)</b>	46.8 $\pm$ 1.8	47.7 $\pm$ 1.7	45.4 $\pm$ 3.0	0.09

**Supplemental table E2.** Markers of renal function and sodium and water homeostasis 24 hours after PBS, DPP3 or PCZ administration. Comparisons were made using ANOVA.

### 4.3 Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que l'administration de DPP3 humain purifié à la souris entraîne une baisse des résistances rénovasculaires responsable d'une augmentation du débit sanguin rénal alors que la pression artérielle systémique n'est pas affectée significativement. De plus, l'administration de DPP3 est associée à une diminution de la vasoréactivité systémique et rénale en réponse à l'angiotensine II. Nous avons démontré que l'effet rénovasculaire de DPP3 était dû à diminution de la stimulation d'AT1R à la suite du clivage des angiotensines II, III et IV. De plus, l'administration de DPP3 s'accompagne d'un relargage de catécholamines endogènes responsable du maintien de la pression artérielle malgré le clivage de peptides vasoconstricteurs.

Le principal point fort de ce travail est l'utilisation systématique de techniques de référence. La pression artérielle a été mesurée de manière invasive, par cathétérisme direct de l'artère fémorale. De même le débit sanguin rénal a été mesuré directement par un débitmètre à temps de vol. Enfin la détermination des concentrations des angiotensines circulantes a été réalisée selon la technique de référence associant un prélèvement rapide sur inhibiteur de peptidases à une mesure par chromatographie haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem <sup>240</sup>.

Deux points particuliers, en apparence contradiction avec des résultats préalablement obtenus nécessitent d'être discutés.

*Premièrement*, nos données concernant le débit sanguin rénal peuvent paraître en désaccord avec les données précédemment acquises sur l'effet rénovasculaire de DPP3. En effet dans le travail de *Deniau et al.*, l'injection de DPP3 humain purifié s'accompagnait d'une augmentation progressive de l'index de résistivité supra-rénal qui atteignait un pic à 60 min avant de retrouver sa valeur basale à 120 min. L'index de résistivité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Index de résistivité} = \frac{\text{Vélocité systolique maximale} - \text{Vélocité télédiastolique}}{\text{Vélocité systolique maximale}}$$

L'interprétation classique est que cet index reflète les résistances réno-vasculaires. Par ailleurs, il est souvent supposé que cet index varie en sens inverse du débit sanguin rénal. Selon cette

interprétation, la mise en évidence d'un débit sanguin rénal augmenté à la suite de l'administration de DPP3 dans nos expériences apparaît discordante avec l'augmentation de l'index de résistivité constaté dans le travail de Deniau *et al.*, alors même que la conception des expérimentations est très similaire. Plusieurs éléments sont susceptibles d'expliquer cette discordance apparente :

- Il s'agit de deux techniques différentes d'exploration de l'hémodynamique rénale. Un des déterminants majeurs de l'index de résistivité est la vitesse systolique maximale. Une augmentation de la vitesse systolique maximale est compatible avec une artère rénale de diamètre constant et un débit augmenté, ou une diminution du diamètre de l'artère rénale associée à un débit augmenté, ou même encore un diamètre de l'artère rénale augmenté associé à une augmentation disproportionnée du débit sanguin rénal. Ainsi, il est logiquement impossible de savoir si les modifications de l'index de résistivité reflètent une vasoconstriction et une diminution du débit ou une taille de vaisseau inchangée (ou même augmentée) et une augmentation du débit (Tublin, Tessler, and Murphy 1999; Wan et al. 2008). Des méthodes de calcul du débit ont été développées, basées sur l'intégrale temps-vitesse du flux rénal et sur l'aire de section de l'artère rénale mais la mesure précise de ces variables chez l'animal est difficile et rend l'estimation du débit sanguin rénal par échographie-doppler peu fiable (Wan et al. 2008). A l'inverse la mesure directe du débit sanguin rénal à l'aide d'un débitmètre à temps de vol est une technique fiable et reproductible (Bednarik and May 1995; Dean et al. 1996). Il faut souligner enfin qu'une augmentation du débit sanguin rénal à la suite de l'administration de DPP3 est cohérente avec le mécanisme mis en évidence : levée de la vasoconstriction médiée par AT1R secondaire au clivage des angiotensines par DPP3.

- De plus, la cinétique de ces deux variables est différente. Dans nos expériences, le débit sanguin rénal augmente immédiatement et tend à retrouver une valeur similaire aux contrôles après environ 30 min. Dans le travail de Deniau *et al.*, une augmentation détectable de l'index de résistivité n'est constatée qu'à 60 minutes de l'injection de DPP3. Cette modification tardive de l'index de résistivité pourrait refléter la réponse compensatrice dont la résultante est le retour du débit sanguin rénal aux valeurs contrôles à 60 min alors même que le taux d'angiotensine II est toujours significativement diminué. Selon cette hypothèse, il est intéressant de constater qu'un prétraitement par labetalol (antagoniste des récepteurs adrénergique) est associé avec une poursuite de l'effet rénovasculaire de DPP3 à 60 min, suggérant l'implication des catécholamines endogènes dans cette réponse compensatrice.

*Deuxièmement*, les travaux précédents ont mis en évidence une baisse de la fraction de raccourcissement ventriculaire gauche à la suite de l'administration de DPP3 à la souris, suggérant, en l'absence de dilatation aiguë du ventricule gauche et de variation significative de la fréquence cardiaque, une valeur stable ou diminuée du débit cardiaque par rapport au contrôle. Malheureusement, nous n'avons pas pu mesurer simultanément débit cardiaque et débit sanguin rénal au cours de nos expériences, pour des raisons logistiques.

Néanmoins, l'augmentation du débit sanguin rénal observé dans notre expérience n'est pas incompatible avec une stabilité ou même une baisse du débit cardiaque. En effet, une baisse sélective ou préférentielle des résistances rénovasculaires est susceptible, par un effet de vol vasculaire, d'augmenter la fraction du débit systémique reçu par les reins. Ainsi le débit local augmenterait dans certaines régions et varierait en sens inverse dans d'autres régions de l'organisme. Une telle redistribution du débit a déjà été mise en évidence lors de la modulation du SRAA. Ainsi, chez l'homme sain, l'administration d'angiotensine II à une dose  $\geq 5$  ng/kg/min est associée à une baisse du débit sanguin rénal, alors que le débit musculaire augmente, y compris lorsque la dose d'angiotensine II est suffisante pour entraîner une réduction du débit cardiaque par augmentation de la postcharge <sup>241,242</sup>.

La principale limite de ce travail est l'absence de validation de ces observations dans un modèle d'insuffisance circulatoire établie. Nos résultats permettent néanmoins de souligner plusieurs variables d'intérêt en vue de l'investigation d'un tel modèle.

En conclusion, ce travail confirme l'implication de cDPP3 dans le clivage des angiotensines *in vivo* ainsi que dans la modulation de l'hémodynamique systémique et rénale. Il souligne également l'importance des mécanismes de régulation et notamment l'interaction avec les catécholamines endogènes, responsables du maintien de la pression artérielle lors de l'administration de DPP3 à la souris.

## 5. Modulation du système rénine angiotensine par la dipeptidyl peptidase 3 circulante

### 5.1 Introduction

Le travail précédemment exposé a confirmé le clivage des angiotensines circulantes par cDPP3 *in vivo*. L'injection de DPP3 purifié à la souris entraîne ainsi une diminution de la concentration circulante en angiotensine II, III et IV. En revanche, l'angiotensine I – qui n'est pas un substrat connu de DPP3 – voit sa concentration circulante augmenter.

Nous avons mené des investigations complémentaires pour identifier le mécanisme à l'origine de cette variation de la concentration circulante d'angiotensine I. Notre hypothèse était que la baisse de la concentration circulante d'angiotensine II, et dans une moindre mesure d'angiotensine III et IV, était responsable d'un défaut de stimulation d'AT1R, levant le rétro-contrôle négatif et déclenchant la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires.



**Marked interplay between circulating dipeptidyl peptidase 3 and the renin-angiotensin system.**

Journal:	American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
Manuscript ID	Blue-202308-1324LE
Manuscript Type:	LE - Letter-to-the-Editor
Date Submitted by the Author:	01-Aug-2023
Complete List of Authors:	Picod, Adrien; INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University Nordin, Hugo; INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University Genest, Magali; INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University Assad, Noma; INSERM UMR-S 942 MASCOT - Paris – Cité University Gaudry, Stephane; INSERM UMR-S 1155 CORAKID – Sorbonne University, Paris, France; Université Sorbonne Paris Nord - Campus de Bobigny; Hôpital Avicenne, Medical and surgical intensive care unit Mebazaa, Alexandre; INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University; Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisiere et Fernand-Widal, Department of Anesthesiology and Intensive Care Azibani, Feriel; INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University
Subject Category:	4.09 Molecular Biology of Critical Care < CRITICAL CARE
Keywords:	dipeptidyl peptidase 3, angiotensins, renin-angiotensin system, shock, circulatory failure

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## **Marked interplay between circulating dipeptidyl peptidase 3 and the renin-angiotensin system.**

Running title: Circulating DPP3 and the renin-angiotensin system

Adrien Picod<sup>1</sup>, Hugo Nordin<sup>1</sup>, Magali Genest<sup>1</sup>, Noma Assad<sup>1</sup>, Stéphane Gaudry<sup>2,3,4</sup>, Alexandre Mebazaa<sup>1,5</sup>, Ferial Azibani<sup>1</sup>

### **Affiliations:**

1. INSERM UMR-S 942 MASCOT – Paris – Cité University, Paris, France
2. INSERM UMR-S 1155 CORAKID – Sorbonne University, Paris, France
3. Sorbonne – Paris Nord University
4. Medical and surgical intensive care unit, Avicenne hospital, APHP, Bobigny, France
5. Department of Anesthesiology and Intensive Care, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France.

### **Corresponding author:**

Alexandre Mebazaa, MD PhD

Department of Anesthesiology and Intensive Care, Lariboisière - Saint Louis Hospitals, APHP, Paris, France.

Phone: (+33) 01 49 95 80 71

Fax: (+33) 01 49 95 69 54

Mail: Alexandre.mebazaa@aphp.fr

### **Authors' contributions:**

All the authors listed meet the ICMJE authorship criteria. AP, AM, FA designed the study. All authors contributed to data acquisition and/or interpretation. AP, AM, and FA drafted the manuscript, and all other authors critically reviewed the work and made substantial contribution. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

### **Funding and support:**

The Cardiovascular Markers in Stress Conditions (MASCOT) Research Group is supported by INSERM and a research grant from 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, which allowed salary support for three co-authors (AP, MG, HN).

**Subject category:** 4.9 Molecular Biology of Critical Care

**Keywords:** Dipeptidyl peptidase 3, Renin-angiotensin system, circulatory failure, shock, angiotensin

**Word count:** 603

**Abbreviations:**

AT1R: Angiotensin II type 1 receptor

ACE: Angiotensin converting enzyme

RAS: Renin angiotensin system

(c)DPP3: (circulating) dipeptidyl peptidase 3

To the editor,

A defective angiotensin II - angiotensin II type 1 receptor (AT1R) signaling has been recently suggested to occur in catecholamine-resistant vasodilatory shock and to explain worsening hypotension and acute kidney injury (1). In such conditions, insufficient stimulation of the AT1R receptor would trigger renin release by juxtaglomerular cells, via a biofeedback mechanism (1). This defective angiotensin II – AT1R signaling is classically attributed to a reduced angiotensin converting enzyme (ACE) activity in relation with severe shock-associated (pulmonary) endotheliopathy, leading to an absolute angiotensin II deficiency. Since ACE catalyzes the formation of angiotensin II from angiotensin I, the finding of a high angiotensin I/II ratio in critically ill patients with catecholamine-resistant vasodilatory shock apparently supported this hypothesis (2).

In a previous correspondence, we suggested another hypothesis to explain the renin angiotensin system (RAS) alterations observed during vasodilatory shock. Indeed, high circulating dipeptidyl peptidase 3 (cDPP3) concentration and activity has been observed in critically ill patients, notably during circulatory failure (3). In such context, high cDPP3 is associated with poor outcomes, including a high need of catecholamine support, a high need for renal replacement therapy and poor survival (4,5). As DPP3 is an enzyme that cleaves angiotensin II but not angiotensin I, we suggested that high cDPP3 could recapitulate the biochemical findings generally attributed to ACE deficiency during catecholamine-resistant vasodilatory shock (6).

We now provide experimental data to support our hypothesis. The aforementioned assumptions were tested in 10-week-old anesthetized C57Bl6/J mice in which high circulating DPP3 was artificially induced by an intravenous bolus of purified human DPP3. Fifteen minutes after injection, DPP3-injected mice had significantly lower angiotensin II ( $20.95 \pm 15.26$  vs  $62.39 \pm 44.64$ ,  $p=0.005$ ) and higher angiotensin I ( $194.99 \pm 108.78$  vs  $93.97 \pm 48.95$ ,  $p=0.02$ ) concentrations leading to a higher angiotensin I/II ratio ( $10.47 \pm 3.57$  vs  $1.74 \pm 0.59$ ,  $p<0.0001$ ), in comparison with phosphate buffered saline-injected mice. Additionally, plasma renin activity was increased in DPP3-injected mice ( $9371 \pm 5225$  vs  $4176 \pm 1394$ ,  $p<0.0001$ ). As by design, plasma renin activity depends both on active renin and angiotensinogen concentrations, the above-mentioned result was confirmed using a more standardized assay on plasma samples with addition of exogenous angiotensinogen termed plasma renin

concentration (7). The plasma renin concentration assay led to similar results with a strong correlation between the two methods ( $r=0.941$ ,  $p<0.0001$ ), thus confirming that the increase in plasma renin activity was due to renin release. Notably, aldosterone concentration did not significantly differ between PBS- or DPP3-injected mice possibly due to the short time interval between DPP3 injection and sampling (table 1). Taken together, our data suggest that insufficient AT1R stimulation secondary to DPP3-mediated angiotensin II cleavage triggered renin release, ultimately leading to increased transformation angiotensinogen into angiotensin I and a higher angiotensin I/II ratio (**figure 1**).

More generally, RAS alterations in critically ill patients likely involve multiple mechanisms, all ultimately leading to insufficient AT1R stimulation and triggering renin release. This includes:

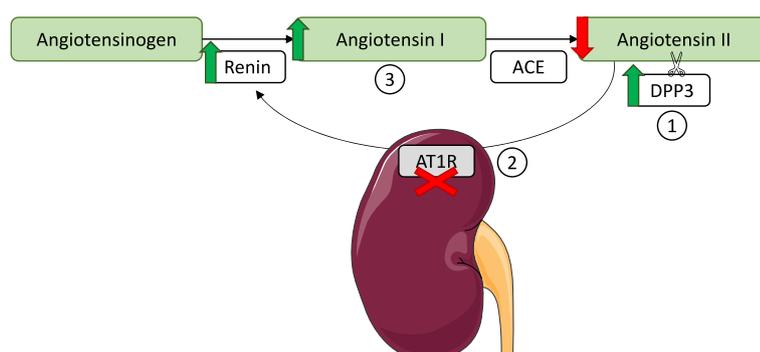
- i. Decreased angiotensin II generation, e.g. due to decreased ACE activity in the context of shock-associated endotheliopathy or due to the premorbid use of ACE inhibitors (2).
- ii. Excessive angiotensin II degradation by peptidases which activity increases during shock, e.g. DPP3
- iii. Unavailability of membrane-bound AT1R receptor either secondary to decreased synthesis induced by over production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines; or to receptor internalization (8–10) .

In summary, our study demonstrated that high cDPP3 rapidly and markedly alter the RAS in normal mammals, suggesting an important role of high circulating DPP3 in catecholamine-resistant vasodilatory shock. Our study further confirms that the ang I/II ratio should not be systematically interpreted solely as a marker of ACE activity.

**Table 1.** Renin angiotensin system evaluation following DPP3 administration to mice.

	<b>PBS</b> (n=10)*	<b>DPP3</b> (n=10)*	<b>p</b>
cDPP3 activity (U/L)	70.43 ± 28.14	68770.55 ± 4225.62	<0.0001
Angiotensin I (pmol/L)	93.97 ± 48.95	194.99 ± 108.78	0.02
Angiotensin II (pmol/L)	62.39 ± 44.64	20.95 ± 15.26	0.005
Plasma renin activity (Ang I pmol/L.h-1)	4176 ± 1394	9371 ± 5225	<0.0001
Plasma renin concentration (Ang I nmol/L.h-1)	76 ± 32	146 ± 38	0.0007
Aldosterone (pmol/L)	778 ± 198	723 ± 248	0.59

Variables are expressed as means ± SD. The normality of distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test and comparison between groups was performed using the Welch's test or the Mann-Whitney test as appropriate. \*Due to the large volume of plasma needed and the necessity to sample in presence of a cocktail of peptidase inhibitor for angiotensin peptides determination, two different (satellite) groups of 10 mice were used for each condition: One for angiotensin peptides and another for aldosterone, plasma renin activity, plasma renin concentration and cDPP3 activity. cDPP3: circulating dipeptidyl peptidase 3.



**Figure 1.** high cDPP3 triggers a compensatory renin release. DPP3-mediated angiotensin II cleavage (1) leads to decreased AT1R agonism triggering renin release by the juxtaglomerular cells (2). Renin then cleaves angiotensinogen, leading to increased angiotensin I (3). DPP3: Dipeptidyl peptidase 3. AT1R: Angiotensin II type 1 receptor.

## References

1. 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. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jul 1;
2. Bellomo R, Wunderink RG, Szerlip H, English SW, Busse LW, Deane AM, et al. Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. *Crit Care Lond Engl*. 2020 06;24(1):43.
3. Deniau B, Picod A, Van Lier D, Vaittinada Ayar P, Santos K, Hartmann O, et al. High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort. *Br J Anaesth*. 2022 Feb;128(2):e54–7.
4. Blet A, Deniau B, Santos K, van Lier DPT, Azibani F, Wittebole X, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit Care Lond Engl*. 2021 Feb 15;25(1):61.
5. van Lier D, Picod A, Marx G, Laterre PF, Hartmann O, Knothe C, et al. Effects of enrichment strategies on outcome of adreuzumab treatment in septic shock: Post-hoc analyses of the phase II adrenomedullin and outcome in septic shock 2 trial. *Front Med*. 2022;9:1058235.
6. Picod A, Deniau B, Vaittinada Ayar P, Genest M, Julian N, Azibani F, et al. Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Feb 15;203(4):526–7.
7. Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H137-152.
8. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2001 Aug;38(2):177–82.
9. Nakada T aki, Russell JA, Boyd JH, McLaughlin L, Nakada E, Thair SA, et al. Association of angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene polymorphism with increased mortality in septic shock. *Crit Care Med*. 2011 Jul;39(7):1641–8.
10. Mederle K, Schweda F, Kattler V, Doblinger E, Miyata K, Höcherl K, et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit Care Lond Engl*. 2013 Jul 11;17(4):R130.

### 5.3 Discussion

Les investigations menées démontrent qu'un relargage de rénine est responsable de l'augmentation de la concentration circulante d'angiotensine I à la suite de l'injection de DPP3 purifié à la souris. Ce relargage de rénine est vraisemblablement secondaire à la levée de l'inhibition médiée par AT1R au niveau des cellules juxta-glomérulaires en raison de la baisse de la concentration circulante d'angiotensine II.

Ces résultats confirment notre hypothèse initiale <sup>243</sup>. Ainsi, une concentration importante de cDPP3 reproduit les anomalies caractéristiques du SRAA retrouvée chez les patients présentant une insuffisance circulatoire à prédominance distributive : concentration ou activité rénine élevée et élévation du ratio angiotensine I / angiotensine II <sup>195,197</sup>

Plus largement, la dégradation de l'angiotensine II par des peptidases comme cDPP3 s'inscrit comme l'un des mécanismes potentiels aboutissant à un défaut de stimulation d'AT1R au cours de l'insuffisance circulatoire.

## Discussion générale

Au cours des travaux présentés, nous avons montré que les hautes concentrations de cDPP3 étaient plus particulièrement retrouvées chez les patients ayant une insuffisance circulatoire. Nos travaux ont permis d'étendre l'association entre une concentration de cDPP3 élevée et la mortalité, initialement décrite au cours du choc cardiogénique ischémique, du choc septique et de l'insuffisance circulatoire associée aux brûlures graves aux patients souffrant de choc hémorragique et de choc cardiogénique de cause non ischémique. Dans cette dernière situation, la concentration de cDPP3 initiale et sa variation au cours des premiers jours de prise en charge est également associée aux recours aux supports d'organes, particulièrement aux supports cardiovasculaires (vasopresseurs, inotropes et/ou assistance circulatoire mécanique transitoire) et à l'épuration extra-rénale. Sur un plan physiopathologique, nous avons confirmé *in vivo* le clivage des angiotensines circulantes par de hautes concentrations de cDPP3. Chez la souris, ce clivage se traduit par une augmentation du débit sanguin rénal sans modification de la pression artérielle en raison du relargage de catécholamines endogènes.

Ces travaux confirment le rôle pronostique de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire mais plus encore démontrent le rôle actif de cDPP3 dans la genèse et l'entretien de l'insuffisance circulatoire et de ses conséquences rénales.

Concernant les propriétés pronostiques de cDPP3, nous avons établi qu'elles sont vraies quelle que soit la cause de l'insuffisance circulatoire. De plus, la persistance de concentrations élevées au cours des premiers jours de prise en charge en réanimation est associée à un pronostic particulièrement défavorable et notamment à une mortalité à court terme très élevée, de l'ordre de 74% dans notre travail s'intéressant au choc cardiogénique. Les données de nos études expérimentales suggèrent qu'une concentration et donc une activité de cDPP3 qui demeure élevée est associée à des perturbations biochimiques perpétuant les dysfonctions d'organe en affectant négativement le tonus vasculaire, la contractilité myocardique ou encore l'hémodynamique rénale <sup>151</sup>. Alternativement, étant donné la demi-vie courte de DPP3 dans la circulation (20 à 70 min), la persistance de concentrations élevées pendant plusieurs jours signe la persistance du stimulus à l'origine de la libération de DPP3 <sup>121,151</sup>. La nature de ce stimulus est inconnue à ce jour mais certains

travaux ont souligné l'association à la mort cellulaire, suggérant que le relargage de DPP3 puisse être le témoin d'une hypoperfusion tissulaire persistante <sup>124</sup>.

Il est intéressant de souligner que dans notre travail ainsi que dans les travaux précédents s'intéressant à la cinétique de cDPP3, peu de patients ayant une concentration sous le seuil critique voient leur concentration augmenter dans les premiers jours : 6% dans notre travail consacré au choc cardiogénique, 6% dans le travail de Blet *et al.*, consacré au choc septique <sup>152</sup>. En franc contraste, plus de la moitié des patients ayant une concentration initialement élevée conservent une concentration élevée dans les premiers jours, associée à un pronostic sombre. Cette observation souligne la forte valeur prédictive négative pour une évolution défavorable quand la concentration de cDPP3 est sous le seuil critique. Ceci suggère aussi que cDPP3 puisse être utilisé comme un biomarqueur d'enrichissement dans des essais évaluant des stratégies thérapeutiques alternatives pour sélectionner une population à plus haut risque d'évolution défavorable.

Sur le plan expérimental, nos données confirment qu'une concentration élevée de cDPP3 est responsable du clivage excessif et donc de la diminution de la concentration circulante en angiotensine II. Nos expérimentations confirment qu'une activité cDPP3 élevée perturbe le SRAA de manière similaire à ce qui a été observé chez les patients atteints d'insuffisance circulatoire distributive, principalement atteints de choc septique <sup>195,197</sup>. Ainsi cDPP3 participe au défaut de stimulation de AT1R évoqué au cours du choc septique, dont les principales conséquences sont l'aggravation de l'hypotension artérielle et l'apparition d'une insuffisance rénale <sup>195</sup>. Il est important de noter que si le clivage de l'angiotensine II joue vraisemblablement un rôle majeur, la diminution des concentrations circulantes d'angiotensine III et l'angiotensine IV, deux agonistes de AT1R participent probablement également à l'effet de cDPP3. L'effet de cDPP3 sur les concentrations circulantes d'angiotensine III et d'angiotensine IV reflète probablement à la fois un clivage direct mais aussi un défaut de génération en raison d'une concentration insuffisante du précurseur (angiotensine II).

A l'inverse, l'augmentation de la concentration d'angiotensine II chez les souris recevant l'anticorps inhibant cDPP3 en comparaison aux contrôles souligne le rôle de cDPP3 dans le métabolisme de l'angiotensine II, y compris pour des concentrations de cDPP3 d'ordre physiologique.

Nos expériences mettent en évidence deux conséquences importantes du clivage des agonistes endogènes de AT1R pour de futurs travaux investiguant le rôle de DPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire.

Premièrement, le défaut de stimulation de AT1R s'accompagne d'une élévation du débit sanguin rénal. Comme exposé en introduction, l'effet vasoconstricteur préférentiel de l'angiotensine II sur l'artériole efférente est responsable d'une modulation de la pression de filtration glomérulaire et, toutes choses égales par ailleurs, du DFG. La perte isolée de la vasoconstriction médiée par AT1R ne semble pas suffisante pour entraîner de modifications détectable du DFG chez l'animal ou l'homme sain<sup>190,244</sup>. Ainsi, l'absence de modification du DFG dans nos expériences pourrait refléter l'intégrité des mécanismes de compensation endogènes et/ou la brièveté des modifications hémodynamiques induites par un bolus unique de DPP3. En revanche, en situation d'insuffisance circulatoire où l'élévation de DPP3 est soutenue et les mécanismes de régulation souvent altérés, des conséquences fonctionnelles pourraient apparaître.

Deuxièmement, dans notre expérience la pression artérielle n'est pas affectée par l'administration de DPP3 en raison d'un relargage de catécholamines endogènes. En effet, un effet hypotenseur n'est démasqué que lors du blocage adrénergique obtenu par le labetalol. En situation d'insuffisance circulatoire, deux scénarios sont envisageables. Si la stimulation sympathique est déjà maximale, le relargage de DPP3 pourrait être associé avec une majoration de l'hypotension. Alternativement, la pression artérielle pourrait être maintenue au prix d'une stimulation sympathique accrue et donc potentiellement d'une majoration des effets indésirables associés aux catécholamines au cours de l'insuffisance circulatoire : consommation en oxygène accrue, risque augmenté d'arythmie, toxicité myocardique directe, immunosuppression et croissance bactérienne facilitée<sup>53-57</sup>.

#### *Principales limites des travaux présentés :*

Dans nos travaux cliniques, il n'a pas été possible d'étudier avec précision la relation entre la concentration de cDPP3 ou ses variations dans le temps et le phénotype de l'insuffisance circulatoire. Ainsi l'absence de données hémodynamiques précises n'a pas permis de déterminer si l'élévation de cDPP3 était particulièrement associée à un mécanisme prédominant. La relation mise en évidence entre cDPP3 et le clivage des angiotensines pourrait laisser supposer une plus grande importance du phénomène distributif chez les patients chez qui la concentration de cDPP3 est élevée.

En revanche au cours du choc hémorragique ou du choc cardiogénique, le mécanisme prédominant initialement est différent, respectivement hypovolémique ou cardiogénique. Il serait intéressant de déterminer si la concentration de cDPP3 est associée avec l'apparition d'une part distributive et/ou cardiogénique surajoutée.

De plus, la caractérisation précise du phénotype hémodynamique d'une cohorte de patients en situation d'insuffisance circulatoire associée au dosage de cDPP3 et à celui de ses substrats connus pourrait permettre de corréliser les données hémodynamiques aux variations des médiateurs moléculaires et de mieux comprendre les mécanismes à l'œuvre. Cette stratégie se heurte cependant à de nombreux écueils : la caractérisation fine de l'hémodynamique d'une insuffisance circulatoire complexe fait fréquemment appel à des techniques invasives et/ou laborieuses, difficilement réalisables dans le contexte et l'urgence de la prise en charge du patient en réanimation. Par ailleurs, la mesure des substrats de DPP3 impose un prélèvement rapide et rigoureux : effectué sur glace sur un tube pré-rempli par un cocktail d'inhibiteur de peptidases, centrifugé et congelé rapidement par immersion dans l'azote liquide. Ces contraintes rendent la planification d'une telle étude difficile.

La principale limite de notre travail expérimental est l'absence de validation des observations dans un modèle d'insuffisance circulatoire. Si la conception de notre expérience a permis une investigation précise du mode d'action de DPP3 et du procizumab en s'affranchissant des effets multifactoriels complexes d'une insuffisance circulatoire, les études futures devront se concentrer sur des modèles pathologiques plus complexes. En particulier, nos expériences suggèrent l'intérêt d'administrer du procizumab pour inhiber cDPP3 et augmenter les taux d'angiotensine II circulants mais ne permettent pas d'affirmer un bénéfice thérapeutique. Une étude dédiée dans un modèle d'insuffisance circulatoire est nécessaire. Au vu des données préliminaires, un modèle d'état de choc septique, reproduisant fidèlement les caractéristiques hémodynamiques et fonctionnelles rénales observées au cours du choc septique humain paraît souhaitable <sup>86</sup>. Une attention particulière pourrait être portée aux concentrations de catécholamines endogènes et à leurs effets indésirables potentiels, notamment myocardiques (consommation en oxygène du myocarde, nécrose myocardique, arythmie) ainsi qu'à l'hémodynamique et la fonction rénale. Dans une perspective pré-clinique, un tel modèle devrait bénéficier de conditions de réanimation proches de la prise en charge du choc septique chez l'humain et incluant notamment l'administration titrée d'une expansion volémique ainsi qu'une antibiothérapie efficace <sup>245,246</sup>.

Par ailleurs, alors que des travaux précédents ont mis en évidence une diminution de la contractilité myocardique à la suite de l'administration de DPP3 purifié, nos expérimentations se sont concentrées sur des aspects vasculaires. Ainsi, le mécanisme liant cDPP3 à la contractilité myocardique reste à identifier avec précision. Il paraît peu probable que DPP3 exerce un effet inotrope négatif direct sur le muscle myocardique. Plus probablement, l'augmentation de l'activité circulante de DPP3 serait responsable du clivage d'un substrat ayant des propriétés inotropes positives et/ou de la formation d'un produit inotrope négatif. L'angiotensine II pourrait là aussi être un substrat candidat de DPP3. En effet, un effet inotrope de l'angiotensine II a été mis en évidence chez l'animal bien qu'il reste à démontrer formellement chez l'Homme <sup>172,173</sup>. Alternativement, les enképhalines pourraient être ce substrat inotrope <sup>157,158</sup>. Enfin, il ne faut pas exclure la possibilité que d'autres substrats ou produits de DPP3 encore non identifiés puissent être impliqués dans l'effet observé. L'identification de tels substrats représente un défi technique au vu de la faible taille des peptides candidats mais pourrait être envisagée selon une stratégie d'analyse différentielle du plasma d'animaux chez qui l'activité de l'enzyme est augmentée - via l'administration de DPP3 purifié ; ou inhibée, via l'administration de procizumab. La possibilité d'effets pléiotropes de DPP3 soulève l'intérêt d'un monitoring multimodal associant mesure des fonctions cardiaque, vasculaire, et notamment des débits sanguins régionaux. Un tel monitoring est difficile à mettre en place chez le petit animal et le recours à un plus gros animal pourrait s'avérer intéressant.

## Perspectives générales

Les travaux que nous souhaitons mener dans les prochains temps visent à démontrer l'intérêt clinique de la mesure de cDPP3 et à évaluer l'intérêt thérapeutique d'une stratégie d'inhibition de cDPP3 par un anticorps monoclonal.

Si la valeur pronostique de cDPP3 dans des situations d'insuffisance circulatoire est maintenant bien établie, l'intérêt du dosage au sein d'une stratégie thérapeutique devra être évalué de manière prospective. Ainsi devra être déterminé si la mesure de cDPP3 permet d'ajuster la prise en charge pour *in fine* améliorer le pronostic du patient, en se basant sur des critères cliniquement pertinents. A titre d'exemple, cDPP3 pourrait être extrêmement utile dans l'enrichissement des patients inclus dans les études thérapeutiques dans le contexte du choc cardiogénique. Ainsi, au cours des dernières années, le score de la *Society for Cardiovascular Angiography and Interventions* a été utilisé comme critère d'enrichissement mais même si ce score a le mérite d'être le premier à hiérarchiser la sévérité des patients en choc cardiogénique, chaque classe reste très hétérogène<sup>247,248</sup>. Nous tenterons de démontrer que cDPP3 comme critère d'inclusion serait un biomarqueur d'enrichissement idéal pour sélectionner des patients inclus dans des essais cliniques testant l'orientation précoce vers un centre de référence, l'utilisation préférentielle d'un vasopresseur (par exemple l'angiotensine II) voire la mise en place précoce d'une assistance circulatoire mécanique temporaire.

Plus spécifiquement, le rôle supposé de cDPP3 dans la genèse et/ou l'entretien de l'insuffisance circulatoire suggère l'intérêt de son ciblage à visée thérapeutique.

Cette stratégie est en cours d'évaluation dans des modèles porcins d'insuffisance circulatoire, en collaboration avec le laboratoire expérimental de soins intensifs de l'université libre de Bruxelles (Dr Antoine Herpain – Pr Taccone). Sont envisagés un modèle de choc septique ainsi qu'un modèle d'insuffisance circulatoire complexe associant une composante cardiogénique et une composante distributive à la suite d'un infarctus du myocarde reperfusé.

En parallèle, le procizumab, l'anticorps monoclonal humanisé inhibant l'activité de cDPP3 utilisé dans nos expérimentations est actuellement en phase de développement pré-clinique. Une phase I chez l'Homme devrait débuter en fin d'année 2023.

Les données acquises au cours de ces expérimentations permettront de confirmer l'implication de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire, d'évaluer l'efficacité et la sécurité de son ciblage par le procizumab avant d'envisager une phase clinique thérapeutique chez l'Homme.

Sur un plan physiopathologique, la relation entre les substrats de DPP3 et les autres systèmes de régulation de la pression artérielle pourrait être explorée. Dans nos expériences, le relargage de catécholamines endogènes apparaît comme réactionnel à la diminution de la concentration circulante en angiotensines vasoconstrictrices. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer si un mécanisme actif, impliquant un substrat de DPP3 médie le relargage des catécholamines.

Enfin, le mécanisme aboutissant au relargage de DPP3 dans le plasma au cours de l'insuffisance circulatoire demeure inconnu. Si le rôle de la mort cellulaire induite par l'ischémie est une hypothèse crédible, des explorations complémentaires sont nécessaires pour la confirmer et déterminer les mécanismes en jeu.

## Conclusion générale

Au cours des travaux présentés, nous avons montré que l'élévation de la concentration de cDPP3 était plus particulièrement retrouvée chez les patients souffrant d'insuffisance circulatoire. L'association entre une concentration de cDPP3 élevée et la mortalité a été confirmée et étendue aux patients souffrant de choc hémorragique et de choc cardiogénique de cause non ischémique. Sur un plan physiopathologique, le clivage des angiotensines circulantes par de hautes concentrations de cDPP3 a été confirmé *in vivo*. Chez la souris, ce clivage se traduit par une augmentation du débit sanguin rénal tandis que la pression artérielle n'est pas affectée de manière significative, en raison du relargage de catécholamines endogènes. Ces travaux permettent une meilleure compréhension du rôle potentiel de cDPP3 dans la genèse et l'entretien de l'insuffisance circulatoire humaine et ouvrent la voie à son ciblage.

## Bibliographie

1. Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021.
2. Weil MH, Henning RJ. New concepts in the diagnosis and fluid treatment of circulatory shock. Thirteenth annual Becton, Dickinson and Company Oscar Schwidetsky Memorial Lecture. *Anesth. Analg.* 1979;58(2):124–132.
3. LeDran H-F. Traité ou Reflexions Tirées de la Pratique sur les Playes d'Armes à Feu. Paris: Charles Osmont; 1737.
4. Le Dran H-F. A Treatise, Or Reflections, Drawn from Practice on Gun-shot Wounds By Henry Francis LeDran, Translated from the French Original. London: John Clarke; 1743.
5. Guthrie GJ. A treatise on gun-shot wounds, on injuries of nerves, and on wounds of the extremities requiring... amputation... With... plates... enlarged. Burgess & Hill; 1820.
6. Vincent J-L, De Backer D. Circulatory shock. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(18):1726–1734.
7. Lima A, Jansen TC, van Bommel J, Ince C, Bakker J. The prognostic value of the subjective assessment of peripheral perfusion in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 2009;37(3):934–938.
8. Tschoellitsch T, Noitz M, Türk M, Meier J, Dünser MW. The value of clinical signs as indicators of shock. *Intensive Care Med.* 2023;
9. Vincent J-L, Quintairos E Silva A, Couto L, Taccone FS. The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Crit. Care Lond. Engl.* 2016;20(1):257.
10. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert P-E. Relation between muscle Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet Lond. Engl.* 2005;365(9462):871–875.
11. Levy B, Desebbe O, Montemont C, Gibot S. Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. *Shock Augusta Ga.* 2008;30(4):417–421.

12. Vincent JL, Dufaye P, Berré J, et al. Serial lactate determinations during circulatory shock. *Crit. Care Med.* 1983;11(6):449–451.
13. Bakker J, Coffernils M, Leon M, Gris P, Vincent JL. Blood lactate levels are superior to oxygen-derived variables in predicting outcome in human septic shock. *Chest.* 1991;99(4):956–962.
14. Vellinga NAR, Boerma EC, Koopmans M, et al. Mildly elevated lactate levels are associated with microcirculatory flow abnormalities and increased mortality: a microSOAP post hoc analysis. *Crit. Care.* 2017;21(1):255.
15. Nichol AD, Egi M, Pettila V, et al. Relative hyperlactatemia and hospital mortality in critically ill patients: a retrospective multi-centre study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2010;14(1):R25.
16. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801–810.
17. Weil MH, Shubin H. Proposed reclassification of shock states with special reference to distributive defects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1971;23(0):13–23.
18. De Backer D, Biston P, Devriendt J, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N. Engl. J. Med.* 2010;362(9):779–789.
19. Boyle WA, Parvathaneni LS, Bourlier V, et al. iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circ. Res.* 2000;87(7):E18-24.
20. Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MPWJM, van der Hoeven JG, Smits P. In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. *Circulation.* 2006;114(5):414–421.
21. Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, Salzman AL, Szabó C. The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br. J. Pharmacol.* 1997;120(2):259–267.
22. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 2001;20(21):6008–6016.
23. Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. Changes in arterial hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J. Infect.* 2003;47(2):155–160.
24. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Activation of the PGI<sub>2</sub>/IP system

- contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertens. Dallas Tex 1979*. 2008;52(2):330–335.
25. Legrand M, De Backer D, Dépret F, Ait-Oufella H. Recruiting the microcirculation in septic shock. *Ann. Intensive Care*. 2019;9(1):102.
  26. Thiemermann C, Szabó C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90(1):267–271.
  27. Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am. J. Physiol.* 1991;260(2 Pt 2):H305-318.
  28. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 2001;345(8):588–595.
  29. Itskovitz HD, Miller L, Ural W, Zapp J, White R. Inactivation of angiotensin in shock. *Am. J. Physiol.* 1969;216(1):5–10.
  30. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021;47(11):1181–1247.
  31. Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, et al. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N. Engl. J. Med.* 1999;341(9):625–634.
  32. Rossaint R, Afshari A, Bouillon B, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: sixth edition. *Crit. Care Lond. Engl.* 2023;27(1):80.
  33. Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Respir. J.* 2019;54(3):1901647.
  34. Lamontagne F, Richards-Belle A, Thomas K, et al. Effect of Reduced Exposure to Vasopressors on 90-Day Mortality in Older Critically Ill Patients With Vasodilatory

Hypotension: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;323(10):938–949.

35. Lamontagne F, Meade MO, Hébert PC, et al. Higher versus lower blood pressure targets for vasopressor therapy in shock: a multicentre pilot randomized controlled trial. *Intensive Care Med*. 2016;42(4):542–550.
36. Asfar P, Meziani F, Hamel J-F, et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N. Engl. J. Med*. 2014;370(17):1583–1593.
37. Varpula M, Tallgren M, Saukkonen K, Voipio-Pulkki L-M, Pettilä V. Hemodynamic variables related to outcome in septic shock. *Intensive Care Med*. 2005;31(8):1066–1071.
38. Dünser MW, Takala J, Ulmer H, et al. Arterial blood pressure during early sepsis and outcome. *Intensive Care Med*. 2009;35(7):1225–1233.
39. Khanna AK, Kinoshita T, Natarajan A, et al. Association of systolic, diastolic, mean, and pulse pressure with morbidity and mortality in septic ICU patients: a nationwide observational study. *Ann. Intensive Care*. 2023;13(1):9.
40. Tran A, Yates J, Lau A, Lampron J, Matar M. Permissive hypotension versus conventional resuscitation strategies in adult trauma patients with hemorrhagic shock: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Trauma Acute Care Surg*. 2018;84(5):802–808.
41. Jansen TC, van Bommel J, Schoonderbeek FJ, et al. Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2010;182(6):752–761.
42. Hernández G, Ospina-Tascón GA, Damiani LP, et al. Effect of a Resuscitation Strategy Targeting Peripheral Perfusion Status vs Serum Lactate Levels on 28-Day Mortality Among Patients With Septic Shock: The ANDROMEDA-SHOCK Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;321(7):654–664.
43. Zampieri FG, Damiani LP, Bakker J, et al. Effects of a Resuscitation Strategy Targeting Peripheral Perfusion Status versus Serum Lactate Levels among Patients with Septic Shock. A Bayesian Reanalysis of the ANDROMEDA-SHOCK Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2020;201(4):423–429.
44. Monnet X, Marik PE, Teboul J-L. Prediction of fluid responsiveness: an update. *Ann. Intensive Care*. 2016;6:.

45. Myburgh JA, Mythen MG. Resuscitation fluids. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(13):1243–1251.
46. Patterson SW, Starling EH. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J. Physiol.* 1914;48(5):357–379.
47. Sarnoff SJ, Berglund E. Ventricular function. I. Starling's law of the heart studied by means of simultaneous right and left ventricular function curves in the dog. *Circulation.* 1954;9(5):706–718.
48. Levy B, Perez P, Perny J, Thivilier C, Gerard A. Comparison of norepinephrine-dobutamine to epinephrine for hemodynamics, lactate metabolism, and organ function variables in cardiogenic shock. A prospective, randomized pilot study. *Crit. Care Med.* 2011;39(3):450–455.
49. Levy B, Clere-Jehl R, Legras A, et al. Epinephrine Versus Norepinephrine for Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018;72(2):173–182.
50. Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, et al. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 1994;330(24):1717–1722.
51. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent J-L. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis\*. *Crit. Care Med.* 2012;40(3):725–730.
52. Vail E, Gershengorn HB, Hua M, et al. Association Between US Norepinephrine Shortage and Mortality Among Patients With Septic Shock. *JAMA.* 2017;317(14):1433–1442.
53. Wieruszewski ED, Jones GM, Samarin MJ, Kimmons LA. Predictors of dysrhythmias with norepinephrine use in septic shock. *J. Crit. Care.* 2021;61:133–137.
54. Stolk RF, van der Pasch E, Naumann F, et al. Norepinephrine Dysregulates the Immune Response and Compromises Host Defense during Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020;202(6):830–842.
55. Lyte M, Freestone PPE, Neal CP, et al. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet Lond. Engl.* 2003;361(9352):130–135.
56. Durand M, Hagimont E, Louis H, et al. The  $\beta$  1 -Adrenergic Receptor Contributes to

- Sepsis-Induced Immunosuppression Through Modulation of Regulatory T-Cell Inhibitory Function. *Crit. Care Med.* 2022;50(9):e707–e718.
57. Schmittinger CA, Dünser MW, Torgersen C, et al. Histologic pathologies of the myocardium in septic shock: a prospective observational study. *Shock Augusta Ga.* 2013;39(4):329–335.
58. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, et al. Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit. Care Med.* 2003;31(6):1752–1758.
59. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation.* 1997;95(5):1122–1125.
60. Argenziano M, Choudhri AF, Oz MC, et al. A prospective randomized trial of arginine vasopressin in the treatment of vasodilatory shock after left ventricular assist device placement. *Circulation.* 1997;96(9 Suppl):II-286–290.
61. Sims CA, Guan Y, Bergey M, et al. Arginine vasopressin, copeptin, and the development of relative AVP deficiency in hemorrhagic shock. *Am. J. Surg.* 2017;214(4):589–595.
62. Hajjar LA, Vincent JL, Barbosa Gomes Galas FR, et al. Vasopressin versus Norepinephrine in Patients with Vasoplegic Shock after Cardiac Surgery: The VANCS Randomized Controlled Trial. *Anesthesiology.* 2017;126(1):85–93.
63. Dünser MW, Mayr AJ, Ulmer H, et al. Arginine vasopressin in advanced vasodilatory shock: a prospective, randomized, controlled study. *Circulation.* 2003;107(18):2313–2319.
64. Russell JA, Walley KR, Singer J, et al. Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(9):877–887.
65. Gordon AC, Mason AJ, Thirunavukkarasu N, et al. Effect of Early Vasopressin vs Norepinephrine on Kidney Failure in Patients With Septic Shock: The VANISH Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016;316(5):509–518.
66. Hajjar LA, Zambolim C, Belletti A, et al. Vasopressin Versus Norepinephrine for the Management of Septic Shock in Cancer Patients: The VANCS II Randomized Clinical Trial. *Crit. Care Med.* 2019;47(12):1743–1750.
67. Nagendran M, Russell JA, Walley KR, et al. Vasopressin in septic shock: an individual

- patient data meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Med.* 2019;45(6):844–855.
68. Khanna A, English SW, Wang XS, et al. Angiotensin II for the Treatment of Vasodilatory Shock. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(5):419–430.
69. Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? *Intensive Care Med.* 2002;28(9):1208–1217.
70. Boerma EC, Koopmans M, Konijn A, et al. Effects of nitroglycerin on sublingual microcirculatory blood flow in patients with severe sepsis/septic shock after a strict resuscitation protocol: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Crit. Care Med.* 2010;38(1):93–100.
71. Dépret F, Sitbon A, Soussi S, et al. Intravenous iloprost to recruit the microcirculation in septic shock patients? *Intensive Care Med.* 2018;44(1):121–122.
72. Legrand M, Oufella HA, De Backer D, et al. The I-MICRO trial, Ilomedin for treatment of septic shock with persistent microperfusion defects: a double-blind, randomized controlled trial-study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2020;21(1):601.
73. Thiele H, Zeymer U, Neumann F-J, et al. Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(14):1287–1296.
74. Zeymer U, Freund A, Hochadel M, et al. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in patients with infarct-related cardiogenic shock: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* 2023;S0140-6736(23)01607–0.
75. Brenner BM, Troy JL, Daugharty TM, Deen WM, Robertson CR. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. II. Plasma-flow dependence of GFR. *Am. J. Physiol.* 1972;223(5):1184–1190.
76. Wilcox CS. Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J. Clin. Invest.* 1983;71(3):726–735.
77. Edwards RM. Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. *Am. J. Physiol.* 1985;248(6 Pt 2):F779-784.
78. Delles C, Klingbeil AU, Schneider MP, et al. The role of nitric oxide in the regulation of glomerular haemodynamics in humans. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial.*

79. Ichihara A, Imig JD, Inscho EW, Navar LG. Cyclooxygenase-2 participates in tubular flow-dependent afferent arteriolar tone: interaction with neuronal NOS. *Am. J. Physiol.* 1998;275(4):F605-612.
80. Edwards RM, Trizna W, Kinter LB. Renal microvascular effects of vasopressin and vasopressin antagonists. *Am. J. Physiol.* 1989;256(2 Pt 2):F274-278.
81. Edwards RM. Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *Am. J. Physiol.* 1983;244(5):F526-534.
82. Ichikawa I, Brenner BM. Evidence for glomerular actions of ADH and dibutyryl cyclic AMP in the rat. *Am. J. Physiol.* 1977;233(2):F102-117.
83. Barnett R, Singhal PC, Scharschmidt LA, Schlondorff D. Dopamine attenuates the contractile response to angiotensin II in isolated rat glomeruli and cultured mesangial cells. *Circ. Res.* 1986;59(5):529–533.
84. Hoogenberg K, Smit AJ, Girbes AR. Effects of low-dose dopamine on renal and systemic hemodynamics during incremental norepinephrine infusion in healthy volunteers. *Crit. Care Med.* 1998;26(2):260–265.
85. Myers BD, Deen WM, Brenner BM. Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat. *Circ. Res.* 1975;37(1):101–110.
86. Langenberg C, Bellomo R, May C, et al. Renal blood flow in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 2005;9(4):R363-374.
87. Leisman DE, Fernandes TD, Bijol V, et al. Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis induced acute kidney injury. *Kidney Int.* 2020;
88. Wan L, Langenberg C, Bellomo R, May CN. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 2009;13(6):R190.
89. Casellas D, Mimran A. Shunting in renal microvasculature of the rat: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Anat. Rec.* 1981;201(2):237–248.
90. Langenberg C, Gobe G, Hood S, May CN, Bellomo R. Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. *Crit. Care Med.* 2014;42(1):e58-67.

91. Xu C, Chang A, Hack BK, et al. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int.* 2014;85(1):72–81.
92. Adembri C, Sgambati E, Vitali L, et al. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. *Crit. Care Lond. Engl.* 2011;15(6):R277.
93. Fiksen-Olsen MJ, Romero JC. Renal effects of prostaglandin inhibition during increases in renal venous pressure. *Am. J. Physiol.* 1991;260(4 Pt 2):F525-529.
94. Legrand M, Dupuis C, Simon C, et al. Association between systemic hemodynamics and septic acute kidney injury in critically ill patients: a retrospective observational study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2013;17(6):R278.
95. Benes J, Chvojka J, Sykora R, et al. Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2011;15(5):R256.
96. Mohmand H, Goldfarb S. Renal dysfunction associated with intra-abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2011;22(4):615–621.
97. Demiselle J, Seegers V, Lemerle M, et al. Prior Exposure to Angiotensin II Receptor Blockers in Patients With Septic Shock to Individualize Mean Arterial Pressure Target? A Post Hoc Analysis of the Sepsis and Mean Arterial Pressure (SEPSISPAM) Trial. *Crit. Care Med.* 2021;49(4):e412–e422.
98. Chowdhury AH, Cox EF, Francis ST, Lobo DN. A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 2-L infusions of 0.9% saline and plasma-lyte® 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. *Ann. Surg.* 2012;256(1):18–24.
99. Olivier P-Y, Beloncle F, Seegers V, et al. Assessment of renal hemodynamic toxicity of fluid challenge with 0.9% NaCl compared to balanced crystalloid (PlasmaLyte®) in a rat model with severe sepsis. *Ann. Intensive Care.* 2017;7(1):66.
100. McDonald AG, Tipton KF. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *FEBS J.* 2023;290(9):2214–2231.
101. Ellis S, Nuenke JM. Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 1967;242(20):4623–4629.

102. Lee CM, Snyder SH. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J. Biol. Chem.* 1982;257(20):12043–12050.
103. Beauvais A, Monod M, Debeaupuis JP, et al. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 1997;272(10):6238–6244.
104. Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Kimura S, et al. Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* ensures utilization of proteinaceous energy sources. *J. Biol. Chem.* 2011;286(44):38115–38127.
105. Shimamori Y, Watanabe Y, Fujimoto Y. Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1986;34(8):3333–3340.
106. Smyth M, O’Cuinn G. Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences. *J. Neurochem.* 1994;63(4):1439–1445.
107. Melloni E, Salamino F, Sparatore B, et al. Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981;675(1):110–116.
108. Swanson AA, Albers-Jackson B, McDonald JK. Mammalian lens dipeptidyl aminopeptidase III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978;84(4):1151–1159.
109. Lynn KR. The isolation and some properties of dipeptidyl peptidases II and III from porcine spleen. *Int. J. Biochem.* 1991;23(1):47–50.
110. Cruz-Diaz N, Wilson BA, Pirro NT, et al. Identification of dipeptidyl peptidase 3 as the Angiotensin-(1-7) degrading peptidase in human HK-2 renal epithelial cells. *Peptides.* 2016;83:29–37.
111. Mazzocco C, Fukasawa KM, Raymond AA, Puiroux J. Purification, partial sequencing and characterization of an insect membrane dipeptidyl aminopeptidase that degrades the insect neuropeptide proctolin. *Eur. J. Biochem.* 2001;268(18):4940–4949.
112. Hola-Jamriska L, Dalton JP, Aaskov J, Brindley PJ. Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes. *Parasitology.* 1999;118 ( Pt 3):275–282.
113. Diaz JR, Ramírez CA, Nocua PA, et al. Dipeptidyl peptidase 3, a novel protease from *Leishmania braziliensis*. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190618.

114. Tillack M, Biller L, Irmer H, et al. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*. 2007;8:170.
115. Watanabe Y, Kumagai Y, Fujimoto Y. Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1990;38(1):246–248.
116. Sabljčić I, Meštrović N, Vukelić B, et al. Crystal structure of dipeptidyl peptidase III from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *PloS One*. 2017;12(11):e0187295.
117. Abramić M, Zubanović M, Vitale L. Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*. 1988;369(1):29–38.
118. Sobočanec S, Filić V, Matovina M, et al. Prominent role of exopeptidase DPP III in estrogen-mediated protection against hyperoxia in vivo. *Redox Biol*. 2016;8:149–159.
119. Boutin JA. Myristoylation. *Cell. Signal*. 1997;9(1):15–35.
120. Gevaert K, Staes A, Van Damme J, et al. Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC. *Proteomics*. 2005;5(14):3589–3599.
121. Rehfeld L, Funk E, Jha S, et al. Novel Methods for the Quantification of Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) Concentration and Activity in Human Blood Samples. *J. Appl. Lab. Med*. 2019;3(6):943–953.
122. Vanha-Perttula T. Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem*. 1988;177(2):179–195.
123. Sato H, Kimura K, Yamamoto Y, Hazato T. [Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain]. *Masui*. 2003;52(3):257–263.
124. Wattiaux R, Wattiaux-de Coninck S, Thirion J, Gasingirwa M-C, Jadot M. Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem. J*. 2007;403(1):89–95.
125. van Lier D, Beunders R, Kox M, Pickkers P. Associations of dipeptidyl-peptidase 3 with short-term outcome in a mixed admission ICU-cohort. *J. Crit. Care*. 2023;78:154383.
126. van Lier D, Deniau B, Santos K, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 and bioadrenomedullin levels are associated with impaired outcomes in critically ill COVID-19 patients: a prospective international multicentre study. *ERJ Open Res*. 2023;9(1):00342–02022.

127. Bezerra GA, Dobrovetsky E, Viertlmayr R, et al. Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(17):6525–6530.
128. Baral PK, Jajcanin-Jozić N, Deller S, et al. The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 2008;283(32):22316–22324.
129. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur. J. Biochem.* 1984;138(1):9–37.
130. Fukasawa K, Fukasawa KM, Iwamoto H, Hirose J, Harada M. The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. *Biochemistry.* 1999;38(26):8299–8303.
131. Abramić M, Schleuder D, Dolovcak L, et al. Human and rat dipeptidyl peptidase III: biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences. *Biol. Chem.* 2000;381(12):1233–1243.
132. Lu K, Alcivar AL, Ma J, et al. NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress-Induced DPP3-KEAP1 Interaction. *Cancer Res.* 2017;77(11):2881–2892.
133. Shukla AA, Jain M, Chauhan SS. Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells. *FEBS J.* 2010;277(8):1861–1875.
134. Mačak Šafranko Ž, Sobočanec S, Šarić A, et al. The effect of 17 $\beta$ -estradiol on the expression of dipeptidyl peptidase III and heme oxygenase 1 in liver of CBA/H mice. *J. Endocrinol. Invest.* 2015;38(4):471–479.
135. Malovan G, Hierzberger B, Suraci S, et al. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. *FEBS J.* 2023;290(9):2246–2262.
136. Shimamori Y, Watanabe Y, Fujimoto Y. Human placental dipeptidyl aminopeptidase III: hydrolysis of enkephalins and its stimulation by cobaltous ion. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1988;40(3):305–310.
137. Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J.* 2011;278(18):3256–3276.

138. Gamrekelashvili J, Kapanadze T, Han M, et al. Peptidases released by necrotic cells control CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming. *J. Clin. Invest.* 2013;123(11):4755–4768.
139. Jha S, Taschler U, Domenig O, et al. Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. *J. Biol. Chem.* 2020;295(40):13711–13723.
140. Pang X, Shimizu A, Kurita S, et al. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. *Hypertension.* 2016;68(3):630–641.
141. 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;388(3):343–348.
142. Abramić M, Karačić Z, Šemanjski M, Vukelić B, Jajčanin-Jozić N. Aspartate 496 from the subsite S2 drives specificity of human dipeptidyl peptidase III. *Biol. Chem.* 2015;396(4):359–366.
143. Liu Y, Kern JT, Walker JR, et al. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(12):5205–5210.
144. Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, et al. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 2013;73(7):2199–2210.
145. Menale C, Robinson LJ, Palagano E, et al. Absence of Dipeptidyl Peptidase 3 Increases Oxidative Stress and Causes Bone Loss. *J. Bone Miner. Res.* 2019;34(11):2133–2148.
146. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 2004;114(9):1248–1259.
147. Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, et al. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology. Baltim. Md.* 2007;46(5):1597–1610.
148. Yueh M-F, Tukey RH. Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J. Biol. Chem.* 2007;282(12):8749–8758.
149. Wilson LA, Gemin A, Espiritu R, Singh G. ets-1 is transcriptionally up-regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via an antioxidant response element. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*

2005;19(14):2085–2087.

150. Takagi K, Blet A, Levy B, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 and alteration in haemodynamics in cardiogenic shock: results from the OptimaCC trial. *Eur. J. Heart Fail.* 2020;22(2):279–286.

151. Deniau B, Rehfeld L, Santos K, et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. *Eur. J. Heart Fail.* 2020;22(2):290–299.

152. Blet A, Deniau B, Santos K, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2021;25(1):61.

153. Dépret F, Amzallag J, Pollina A, 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 Lond. Engl.* 2020;24(1):168.

154. Deniau B, Blet A, Santos K, 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.

155. König M, Zimmer AM, Steiner H, et al. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature.* 1996;383(6600):535–538.

156. Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 1996;48(4):567–592.

157. Schaz K, Stock G, Simon W, et al. Enkephalin effects on blood pressure, heart rate, and baroreceptor reflex. *Hypertens. Dallas Tex 1979.* 1980;2(4):395–407.

158. Nguyen VT, Wu Y, Guillory AN, et al. Delta-opioid augments cardiac contraction through  $\beta$ -adrenergic and CGRP-receptor co-signaling. *Peptides.* 2012;33(1):77–82.

159. Huang M-H, Wang H-Q, Roeske WR, et al. Mediating delta-opioid-initiated heart protection via the beta2-adrenergic receptor: role of the intrinsic cardiac adrenergic cell. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293(1):H376-384.

160. Eulie PJ, Rhee HM, Laughlin MH. Effects of [Met<sup>5</sup>]enkephalin on regional blood flow and vascular resistance in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 1987;137(1):25–31.

161. Irnaten M, Aicher SA, Wang J, et al. Mu-opioid receptors are located postsynaptically and endomorphin-1 inhibits voltage-gated calcium currents in premotor cardiac parasympathetic neurons in the rat nucleus ambiguus. *Neuroscience*. 2003;116(2):573–582.
162. Kiang JG, Wei ET. Sensitivity to morphine-evoked bradycardia in rats is modified by dynorphin (1-13), Leu- and Met-enkephalin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984;229(2):469–473.
163. Jackson KE, Farias M, Stanfill A, Caffrey JL. Delta opioid receptors inhibit vagal bradycardia in the sinoatrial node. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2001;6(4):385–393.
164. Barrett RJ, Turpin JA, McGuirk BA, Kau ST. Lack of renal tubular and hemodynamic effects of non-selective and delta-opioid receptor antagonism. *Pharmacol. Res. Commun.* 1985;17(1):49–61.
165. Randich A, Callahan MF. [D-Ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide (DALA): characterization of antinociceptive, cardiovascular, and autonomic nervous system actions in conscious and pentobarbital-anesthetized rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986;25(3):641–650.
166. Kapusta DR, Jones SY, DiBona GF. Effects of opioid peptides on neural control of renal function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979*. 1990;15(6 Pt 2):767–773.
167. Bądzyńska B, Lipkowski AW, Sadowski J. An antihypertensive opioid: Biphalin, a synthetic non-addictive enkephalin analog decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Rep. PR*. 2016;68(1):51–55.
168. Kurtz A. Control of renin synthesis and secretion. *Am. J. Hypertens*. 2012;25(8):839–847.
169. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertens. Dallas Tex 1979*. 1996;27(3 Pt 2):465–475.
170. Jan Danser AH, Batenburg WW, van Esch JHM. Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2007;22(5):1288–1292.
171. Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*. 1967;216(5117):762–766.

172. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, et al. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation*. 1990;82(6):1973–1984.
173. Broomé M, Haney M, Häggmark S, et al. Pressure-independent cardiac effects of angiotensin II in pigs. *Acta Physiol. Scand*. 2004;182(2):111–119.
174. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*. 2008;118(24):2523–2532.
175. Li Q, Feenstra M, Pfaffendorf M, Eijnsman L, van Zwieten PA. Comparative vasoconstrictor effects of angiotensin II, III, and IV in human isolated saphenous vein. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1997;29(4):451–456.
176. Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol. Oxf. Engl*. 2006;188(2):129–138.
177. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J. Biol. Chem*. 2001;276(52):48623–48626.
178. Le MT, Vanderheyden PML, Szaszák M, Hunyady L, Vauquelin G. Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J. Biol. Chem*. 2002;277(26):23107–23110.
179. Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2007;293(4):E1092-1102.
180. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertens. Dallas Tex 1979*. 2014;63(6):1138–1147.
181. Christen Y, Waeber B, Nussberger J, et al. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation*. 1991;83(4):1333–1342.
182. Kiowski W, Linder L, Kleinbloesem C, van Brummelen P, Bühler FR. Blood pressure control by the renin-angiotensin system in normotensive subjects. Assessment by angiotensin converting enzyme and renin inhibition. *Circulation*. 1992;85(1):1–8.

183. Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 1994;23(4):439–449.
184. Posternak L, Brunner HR, Gavras H, Brunner DB. Angiotensin II blockade in normal man: interaction of renin and sodium in maintaining blood pressure. *Kidney Int.* 1977;11(3):197–203.
185. Roshanov PS, Rochweg B, Patel A, et al. Withholding versus Continuing Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II Receptor Blockers before Noncardiac Surgery: An Analysis of the Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluationN Prospective Cohort. *Anesthesiology.* 2017;126(1):16–27.
186. Carp H, Vadhera R, Jayaram A, Garvey D. Endogenous vasopressin and renin-angiotensin systems support blood pressure after epidural block in humans. *Anesthesiology.* 1994;80(5):1000–1007; discussion 27A-28A.
187. Seidelin PH, Coutie WJ, Pai MS, Morton JJ, Struthers AD. The interaction between noradrenaline and angiotensin II in man: evidence for a postsynaptic and against a presynaptic interaction. *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.* 1987;5(5):S121-124.
188. Hidaka T, Tsuneyoshi I, Boyle WA, et al. Marked synergism between vasopressin and angiotensin II in a human isolated artery. *Crit. Care Med.* 2005;33(11):2613–2620.
189. Hall JE, Coleman TG, Guyton AC, Kastner PR, Granger JP. Control of glomerular filtration rate by circulating angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 1981;241(3):R190-197.
190. Schnermann J, Huang YG, Briggs JP. Angiotensin II blockade causes acute renal failure in eNOS-deficient mice. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS.* 2001;2(1\_suppl):S199–S203.
191. Burnier M, Waeber B, Brunner HR. Clinical pharmacology of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium in healthy subjects. *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.* 1995;13(1):S23-28.
192. White FN, Gold EM, Vaughn DL. Renin-aldosterone system in endotoxin shock in the dog. *Am. J. Physiol.* 1967;212(5):1195–1198.
193. Erdös EG, Massion WH, Downs DR, Gecse A. Effect of the inhibition of angiotensin I converting enzyme in endotoxin and hemorrhagic shock. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.* 1974;145(3):948–951.

194. Gleeson PJ, Crippa IA, Mongkolpun W, et al. Renin as a Marker of Tissue-Perfusion and Prognosis in Critically Ill Patients. *Crit. Care Med.* 2019;47(2):152–158.
195. Bellomo R, Forni LG, Busse LW, et al. Renin and Survival in Patients Given Angiotensin II for Catecholamine-Resistant Vasodilatory Shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020;
196. Flannery AH, Ortiz-Soriano V, Li X, et al. Serum renin and major adverse kidney events in critically ill patients: a multicenter prospective study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2021;25(1):294.
197. Bellomo R, Wunderink RG, Szerlip H, et al. Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. *Crit. Care Lond. Engl.* 2020;24(1):43.
198. Casey L, Krieger B, Kohler J, et al. Decreased serum angiotensin converting enzyme in adult respiratory distress syndrome associated with sepsis: a preliminary report. *Crit. Care Med.* 1981;9(9):651–654.
199. Müller AM, Gruhn KM, Herwig MC, Tsokos M. VE-cadherin and ACE: markers for sepsis in post mortem examination? *Leg. Med. Tokyo Jpn.* 2008;10(5):257–263.
200. Kaziani K, Vassiliou AG, Kotanidou A, et al. Activated Protein C has No Effect on Pulmonary Capillary Endothelial Function in Septic Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: Association of Endothelial Dysfunction with Mortality. *Infect. Dis. Ther.* 2018;7(Suppl 1):15–25.
201. Krenn K, Höbart P, Poglitsch M, Croizé A, Ullrich R. Equilibrium Angiotensin Metabolite Profiling in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome Indicates Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020;202(10):1468–1471.
202. Pode-Shakked N, Ceschia G, Rose JE, et al. Increasing angiotensin-converting enzyme concentrations and absent angiotensin-converting enzyme activity are associated with adverse kidney outcomes in pediatric septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* 2023;27(1):230.
203. Vliegen G, Kehoe K, Bracke A, et al. Dysregulated activities of proline-specific enzymes in septic shock patients (sepsis-2). *PLoS One.* 2020;15(4):e0231555.
204. Pirracchio R, Deye N, Lukaszewicz AC, et al. Impaired plasma B-type natriuretic peptide clearance in human septic shock. *Crit. Care Med.* 2008;36(9):2542–2546.

205. Vodovar N, Séronde M-F, Laribi S, et al. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 2015;3(8):629–636.
206. Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2003;14(12):5038–5050.
207. Guo D-F, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T. Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;310(4):1254–1265.
208. Nakada T, Russell JA, Boyd JH, et al. Association of angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene polymorphism with increased mortality in septic shock. *Crit. Care Med.* 2011;39(7):1641–1648.
209. Mederle K, Schweda F, Kattler V, et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit. Care Lond. Engl.* 2013;17(4):R130.
210. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertens. Dallas Tex 1979.* 2001;38(2):177–182.
211. Schmidt C, Höcherl K, Kurt B, et al. Blockade of multiple but not single cytokines abrogates downregulation of angiotensin II type-I receptors and anticipates septic shock. *Cytokine.* 2010;49(1):30–38.
212. Vasques-Nóvoa F, Laundos TL, Cerqueira RJ, et al. MicroRNA-155 Amplifies Nitric Oxide/cGMP Signaling and Impairs Vascular Angiotensin II Reactivity in Septic Shock. *Crit. Care Med.* 2018;46(9):e945–e954.
213. Zipser RD, Davenport MW, Martin KL, et al. Hyperreninemic hypoaldosteronism in the critically ill: a new entity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981;53(4):867–873.
214. Findling JW, Waters VO, Raff H. The dissociation of renin and aldosterone during critical illness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987;64(3):592–595.
215. 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;29(10):1703–1709.

216. Corrêa TD, Jeger V, Pereira AJ, et al. Angiotensin II in septic shock: effects on tissue perfusion, organ function, and mitochondrial respiration in a porcine model of fecal peritonitis. *Crit. Care Med.* 2014;42(8):e550-559.
217. Garcia B, Su F, Dewachter L, et al. Myocardial effects of angiotensin II compared to norepinephrine in an animal model of septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* 2022;26(1):281.
218. Del Greco F, Johnson DC. Clinical experience with angiotensin II in the treatment of shock. *JAMA.* 1961;178:994-999.
219. Derrick JR, Anderson JR, Roland BJ. Adjunctive use of a biologic pressor agent, angiotensin, in management of shock. *Circulation.* 1962;25:263-267.
220. Tumlin JA, Murugan R, Deane AM, et al. Outcomes in Patients with Vasodilatory Shock and Renal Replacement Therapy Treated with Intravenous Angiotensin II. *Crit. Care Med.* 2018;46(6):949-957.
221. Chawla LS, Busse L, Brasha-Mitchell E, et al. Intravenous angiotensin II for the treatment of high-output shock (ATHOS trial): a pilot study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2014;18(5):534.
222. Chawla LS, Busse LW, Brasha-Mitchell E, Alotaibi Z. The use of angiotensin II in distributive shock. *Crit. Care Lond. Engl.* 2016;20(1):137.
223. Ham KR, Boldt DW, McCurdy MT, et al. Sensitivity to angiotensin II dose in patients with vasodilatory shock: a prespecified analysis of the ATHOS-3 trial. *Ann. Intensive Care.* 2019;9(1):63.
224. Chawla LS, Ostermann M, Forni L, Tidmarsh GF. Broad spectrum vasopressors: a new approach to the initial management of septic shock? *Crit. Care Lond. Engl.* 2019;23(1):124.
225. Farina N, Bixby A, Alaniz C. Angiotensin II Brings More Questions Than Answers. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 2018;43(11):685-687.
226. La Jolla Pharmaceutical Company. GIAPREZA (angiotensin II) package insert. 2018;
227. Gayat E, Cariou A, Deye N, et al. Determinants of long-term outcome in ICU survivors: results from the FROG-ICU study. *Crit. Care Lond. Engl.* 2018;22(1):8.
228. Karakas M, Akin I, Burdelski C, et al. Single-dose of adrenergic shock versus placebo in acute cardiogenic shock (ACCOST-HH): an investigator-initiated, randomised, double-

blinded, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Respir. Med.* 2022;10(3):247–254.

229. Osman M, Syed M, Patibandla S, et al. Fifteen-Year Trends in Incidence of Cardiogenic Shock Hospitalization and In-Hospital Mortality in the United States. *J. Am. Heart Assoc.* 2021;10(15):e021061.

230. Puymirat E, Fagon JY, Aegerter P, et al. Cardiogenic shock in intensive care units: evolution of prevalence, patient profile, management and outcomes, 1997-2012. *Eur. J. Heart Fail.* 2017;19(2):192–200.

231. Tehrani BN, Truesdell AG, Psotka MA, et al. A Standardized and Comprehensive Approach to the Management of Cardiogenic Shock. *JACC Heart Fail.* 2020;8(11):879–891.

232. McCallister BD, Christian TF, Gersh BJ, Gibbons RJ. Prognosis of myocardial infarctions involving more than 40% of the left ventricle after acute reperfusion therapy. *Circulation.* 1993;88(4 Pt 1):1470–1475.

233. Elbadawi A, Elgendy IY, Mahmoud K, et al. Temporal Trends and Outcomes of Mechanical Complications in Patients With Acute Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2019;12(18):1825–1836.

234. van Diepen S, Katz JN, Albert NM, et al. Contemporary Management of Cardiogenic Shock: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;136(16):e232–e268.

235. Delmas C, Roubille F, Lamblin N, et al. Baseline characteristics, management, and predictors of early mortality in cardiogenic shock: insights from the FRENSHOCK registry. *ESC Heart Fail.* 2022;9(1):408–419.

236. Deniau B, Picod A, Van Lier D, et al. High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort. *Br. J. Anaesth.* 2022;128(2):e54–e57.

237. Harjola V-P, Lassus J, Sionis A, et al. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur. J. Heart Fail.* 2015;17(5):501–509.

238. Beer BN, Jentzer JC, Weimann J, et al. Early risk stratification in patients with cardiogenic shock irrespective of the underlying cause - the Cardiogenic Shock Score. *Eur. J. Heart Fail.* 2022;24(4):657–667.

239. Chawla LS, Bellomo R. Reply to Picod et al.: Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2021;203(4):527–528.
240. Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2016;310(2):H137-152.
241. Motwani JG, Struthers AD. Dose-response study of the redistribution of intravascular volume by angiotensin II in man. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979.* 1992;82(4):397–405.
242. Fliser D, Dikow R, Demukaj S, Ritz E. Opposing Effects of Angiotensin II on Muscle and Renal Blood Flow under Euglycemic Conditions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11(11):2001–2006.
243. Picod A, Deniau B, Vaithinada Ayar P, et al. Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2021;203(4):526–527.
244. Burnier M, Hagman M, Nussberger J, et al. Short-term and sustained renal effects of angiotensin II receptor blockade in healthy subjects. *Hypertens. Dallas Tex 1979.* 1995;25(4 Pt 1):602–609.
245. Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S, et al. Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): An International Expert Consensus Initiative for Improvement of Animal Modeling in Sepsis. *Shock Augusta Ga.* 2018;50(4):377–380.
246. Guillon A, Preau S, Aboab J, et al. Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU. *Ann. Intensive Care.* 2019;9(1):66.
247. Baran DA, Grines CL, Bailey S, et al. SCAI clinical expert consensus statement on the classification of cardiogenic shock: This document was endorsed by the American College of Cardiology (ACC), the American Heart Association (AHA), the Society of Critical Care Medicine (SCCM), and the Society of Thoracic Surgeons (STS) in April 2019. *Catheter. Cardiovasc. Interv. Off. J. Soc. Card. Angiogr. Interv.* 2019;94(1):29–37.
248. Naidu SS, Baran DA, Jentzer JC, et al. SCAI SHOCK Stage Classification Expert Consensus Update: A Review and Incorporation of Validation Studies: This statement was endorsed by the American College of Cardiology (ACC), American College of Emergency Physicians (ACEP), American Heart Association (AHA), European Society of Cardiology

(ESC) Association for Acute Cardiovascular Care (ACVC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Thoracic Surgeons (STS) in December 2021. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2022;79(9):933–946.

### Annexe 1. The renin-angiotensin-aldosterone in septic shock

#### **The renin-angiotensin-aldosterone system in septic shock**

Adrien Picod, Bruno Garcia, Antoine Herpain, Alexandre Mebazaa, Ferial Azibani

#### **Abstract**

Recent years have seen a resurgence of interest in the renin-angiotensin-aldosterone system among critically ill patients. Emerging data suggest that this vital homeostatic mechanism, which plays a crucial role in maintaining systemic and renal hemodynamics during stressful conditions, may be altered in septic shock, ultimately leading to impaired angiotensin II - angiotensin II type 1 receptor signaling. Indeed, available evidence from both experimental models and human studies indicates that alterations in the renin-angiotensin-aldosterone system during septic shock can occur at three distinct levels: 1. Impaired generation of angiotensin II, possibly attributable to defects in angiotensin-converting enzyme activity; 2. Enhanced degradation of angiotensin II by peptidases; and/or 3. Unavailability of angiotensin II type 1 receptor due to internalization or reduced synthesis. These alterations can occur either independently or in combination, ultimately leading to an uncoupling between the renin-angiotensin-aldosterone system input and downstream angiotensin II type 1 receptor signaling. It remains unclear whether exogenous angiotensin II support can adequately address all these mechanisms, and additional interventions may be required. These observations open a new avenue of research and offer the potential for novel therapeutic strategies to improve patient prognosis. In the near future, a deeper understanding of renin-angiotensin-aldosterone system alterations in septic shock should help to decipher patient phenotypes and inform the development of targeted interventions.

**Abstract word count:** 214/250

**Keywords (4/5):** Renin-Angiotensin-Aldosterone System, septic shock, circulatory failure, angiotensin II

**Main text word count:** 3903/4000

## **Abbreviations**

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosterone System

(P)RR: (Pro-)Renin Receptor

ACE: Angiotensin-Converting Enzyme

AT1R: Angiotensin II, Type 1 Receptor

AT2R: Angiotensin II, Type 2 Receptor

DPP3: Dipeptidyl Peptidase 3

AT4R: Angiotensin IV receptor

IRAP: Insulin-Regulated AminoPeptidase

ACE2: Angiotensin-Converting Enzyme

NEP: Nephilysin/neutral endopeptidase

MRGD: MAS-related G-protein-coupled D receptor

AKI: Acute kidney injury

ATRAP: AT1R-Associated Protein

ARAP1: AT1R-Associated Protein 1

## Introduction

Septic shock represents the most severe form of sepsis. Septic shock is characterized by “profound circulatory, cellular, and metabolic abnormalities” and associated with high mortality (1). Vasodilation is the primary feature of sepsis-associated circulatory failure, although a component of hypovolemia and/or myocardial depression is often present. Accordingly, vasopressor support is the cornerstone of the symptomatic management of septic shock and relies on the use of norepinephrine on the frontline and vasopressin as a second line agent (2). More recently, the use of angiotensin II has been suggested for catecholamine-refractory vasodilatory shock, mostly of septic origin. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is a complex homeostatic system with implication in numerous biological processes, with blood pressure maintenance and sodium homeostasis at the forefront. While overactivation of this system has been well-documented in chronic cardiovascular and kidney diseases, leading to a detrimental cycle of excessive vasoconstriction, sodium retention, and maladaptive repair, it is essential to remember that the RAAS primarily acts as a compensatory mechanism to cope with acute aggression. Accordingly, its integrity is crucial to maintain hemodynamics during circulatory stress. Recent data nevertheless suggest that this homeostatic mechanism is altered during the course of septic shock with potential therapeutic implications.

Beginning with a comprehensive overview of the RAAS and its role in maintaining homeostasis, this concise translational review aims to summarize the available evidence regarding RAAS alterations during septic shock, and to discuss the consequences and potential therapeutic strategies. Importantly, a predominant vasodilatory component of circulatory failure could be encountered in other conditions than septic shock such as extensive burns, severe pancreatitis or post-cardiopulmonary bypass circulatory failure. However, most gathered evidence pertains to septic animal models and patients. Accordingly, our focus remains within the septic shock context.

## Overview of the RAAS

The renin-angiotensin-aldosterone system is a complex network of over thirty peptides, enzymes, receptors, and associated proteins (**Figure 1**). The formation of all RAAS effector peptides occurs through the sequential proteolytic cleavage of angiotensinogen, also known as the RAAS proteolytic cascade. Angiotensinogen is an  $\alpha$ -glycoprotein produced by hepatocytes and cleaved by renin to generate the inactive decapeptide angiotensin I. Renin is

an enzyme produced by the juxtaglomerular cells of the kidney with two modes of secretion: A constitutive release of an inactive or pro-renin form; and a regulated pulsatile release of active renin, influenced by various stimuli, most notably a drop in renal perfusion pressure, a low salt intake or the activation of the sympathetic nervous system (**Figure 2**). This finely tuned regulation of renin secretion operates within minutes ensuring precise and timely adjustment of RAAS input and its downstream effects. A slower induction of angiotensinogen synthesis and secretion occurs in response to multiple stress factors such as glucocorticoids, cytokines (interleukine-1 and -6, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ), estrogens, triiodothyronine and angiotensin II (via a positive feedback loop), maintaining a sufficient substrate supply during prolonged stress conditions (3).

Currently, there is no evidence supporting the in vivo conversion of circulating pro-renin into renin. However, this aspect remains relatively underexplored (4). Conversely, the binding of pro-renin to a membrane receptor known as the (pro-)renin receptor (PRR) leads to the non-proteolytic activation of pro-renin and allows the local generation of angiotensin I (4).

The inactive peptide angiotensin I is subsequently cleaved into the principal RAAS effector: the octapeptide angiotensin II by the action of the angiotensin-converting enzyme (ACE). This enzyme exists in two forms: a membrane-bound form, mainly expressed by pulmonary endothelial cells, and a soluble or circulating form. Importantly, data from the literature suggest that, at least in physiological circumstances, most of the conversion activity is carried out by membrane-bound ACE, quantitatively more important (5). Angiotensin II exerts its effect via the angiotensin II, type 1 receptor (AT1R), mediating vasoconstriction, cell proliferation, pro-fibrotic and pro-inflammatory signals, as well as stimulating aldosterone release from the adrenal gland. Additionally, AT1R stimulation on juxta-glomerular cells inhibits renin secretion, in a negative biofeedback mechanism. Another receptor, termed the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) elicits opposite effects. Angiotensin II is further cleaved into angiotensin III by aminopeptidase A and subsequently into angiotensin IV by aminopeptidase N. Alternatively, angiotensin II can be directly cleaved into angiotensin IV by dipeptidyl peptidase 3 (DPP3). Angiotensin III binds to AT1R and AT2R with similar affinity as angiotensin II, thereby producing similar effects, albeit with faster clearance (6). Angiotensin IV also exhibits low-affinity binding to angiotensin II receptors but also possess a specific receptor initially referred to as the angiotensin IV receptor (AT4R) and later identified as the insulin-regulated aminopeptidase (IRAP), a transmembrane aminopeptidase. Binding of angiotensin IV inhibit the enzymatic activity of IRAP, thereby extending the half-life of its natural substrates such as oxytocin or vasopressin (7,8).

Alongside this well-established “classical” RAAS, a newly recognized “alternative” system has recently been brought to light. Entry into this alternative system can occur at various level. An ACE homolog called angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) allows the formation of angiotensin 1-9 from angiotensin I or angiotensin 1-7 from angiotensin II. Additionally, angiotensin 1-7 can be generated by prolyl peptidases from angiotensin II or directly from angiotensin I by neprilysin (NEP) also known as neutral endopeptidase. However, the respective contributions of these enzymes to angiotensin 1-7 generation remain poorly investigated. ACE catalyzes the formation of angiotensin 1-7 from angiotensin 1-9 and further converts it into angiotensin 1-5. The two primary effectors of this “alternative” system, angiotensin 1-7 and angiotensin 1-5 mediate vasodilatory, natriuretic, anti-fibrotic and anti-inflammatory effects through activation of the MAS receptor (9).

Finally, more recent investigations have unveiled the existence of a third group of RAAS peptides known as alatensins. These peptides differ from the previously described ones by the presence of an alanine in the N-terminal position, rather than an arginine. Thus far, two members of the alatensin family have been identified in vivo: angiotensin A or ala1-angiotensin II, and alamandine or ala1-angiotensin 1-7. Angiotensin A acts as a ligand for both AT1R and AT2R while alamandine exerts its effects through the MAS-related G-protein-coupled receptor D (MRGD) (10,11). It is conceivable that future research may uncover additional members of the alatensin family in the years to come (12).

Overall, the classical RAAS could is generally associated with vasoconstrictive, pro-fibrosis, and pro-inflammatory effects, while the alternative RAAS act as a counter-balancing system, mediating vasodilatory, anti-fibrosis, and anti-inflammatory effects. The alatensins represents an intermediate system with angiotensin A resembling angiotensin II and alamandine resembling angiotensin 1-7. However, due to the rapid conversion of angiotensin A into alamandine, the overall impact effect of the alatensin system tends to resembles that of the alternative RAAS (10,11). It is important to note that this dichotomy mainly arises from observations and experiments conducted in chronic settings that may not accurately reflect acute conditions such as circulatory failure. Furthermore, the same peptide can yield different effects depending on the receptor it interacts with (e.g., angiotensin II via AT1R or AT2R) suggesting that the modulation of respective receptor abundance in acute situations may act as a potential modifier of the net peptide action.

## **Current understanding of the RAAS during shock**

### *The RAAS as a compensatory mechanism during circulatory stress*

There is a distinct contrast between physiology and pathology regarding RAAS dependency. In purely physiological settings, when salt intake is sufficient and the blood pressure maintaining systems are intact, RAAS integrity appears to be non-essential. For instance, under such conditions, the administration of a renin antagonist or an AT1R antagonist leads to minimal short-term hemodynamic effects in awake healthy animals and humans (13,14). It is worth noting that in the same conditions, an ACE inhibitor results in a significant reduction in blood pressure because ACE catalyzes the degradation of bradykinin, a potent vasodilator (14). Conversely, the RAAS assumes a pivotal role in stress conditions by facilitating the maintenance of blood pressure primarily through the vasoconstrictive and anti-natriuretic actions of angiotensin II, as well as angiotensin II-induced secretion of aldosterone, potentiating sodium reabsorption. Therefore, prior sodium depletion unmasks the hypotensive effect of AT1R antagonist in healthy humans (15). Patients taking RAAS inhibitors are more likely to experience general anesthesia-induced hypotension (16). In this specific context, it has been elegantly demonstrated that the major systems of blood pressure regulation, namely, the sympathetic system, the vasopressinergic system and the RAAS, are intricately interconnected and capable of compensating for the dysfunction of one another. However when all three systems are compromised, life-threatening hypotension occur (17). The close interconnection between these three systems is further emphasized by the evidence of synergy among them. For instance, the vasoconstrictive response to angiotensin II is enhanced in presence of norepinephrine or vasopressin (18,19).

The short-term effects of RAAS on glomerular function relies both on the modulation of renal perfusion pressure, but also on a differential action on the two vascular poles of the glomerulus. Angiotensin II predominantly induces vasoconstriction of the efferent glomerular arteriole rather than of the afferent arteriole. Consequently, the loss of AT1R-dependent vasomotor tone tends to lower glomerular capillary pressure, resulting in a decrease of glomerular filtration rate (20). In healthy animals and humans, these hemodynamic alterations typically do not translate into significant functional changes. Thus, the administration of an AT1R antagonist to healthy mice or humans does not affect glomerular filtration rate. (21,22).

However, in a situation of aggression, the use of RAAS inhibitor precipitates the reduction of glomerular filtration rate (20).

Animal models of septic shock have provided compelling evidence regarding the crucial role of RAAS integrity in maintaining systemic and renal hemodynamic. Thus, administration of RAAS inhibitors has been associated with worse systemic hemodynamic and increased severity of acute kidney injury (AKI) in experimental septic shock (23,24). It is noteworthy that in the early stage of experimental and human sepsis-associated AKI, the decline in glomerular filtration rate is associated with elevated renal blood flow and reduced renovascular resistances (25). This decoupling between flow and glomerular filtration may be explained by a preferential efferent arteriole vasodilation, resulting in the loss of post-glomerular resistance leading to decreased glomerular capillary pressure and ultimately a reduction in glomerular filtration rate (**figure 3**). While numerous factors have been implicated in the genesis of vasodilation during sepsis, the preferential involvement of the efferent arteriole suggest that angiotensin II – AT1R signaling inadequately opposes these vasodilating substances. In experimental models, angiotensin II restores renal blood flow to control levels and is associated with improved glomerular function (24,26). Another hypothesis that may explain the hemodynamic profile of sepsis-associated AKI is the opening of periglomerular shunts. Although the existence of such shunts has been demonstrated in healthy animals, their role in human sepsis-associated AKI remains to be established (27). Nevertheless, in the presence of a shunt, a decreased in efferent resistance such is likely to favor the shunt, with the blood flow following the path of least resistance (**figure 3**). The observation of minimal histologic changes in early sepsis-associated AKI suggests that hemodynamic alterations play a significant role in renal function impairment (24,28).

#### *RAAS alterations during septic shock*

Current evidence suggest that this crucial compensatory system may falter in the context of septic shock. In critically ill patients, elevated renin concentration has been associated with lower blood pressure, a higher incidence of major adverse kidney events, and increased mortality rate and (29–31). During catecholamine-resistant vasodilatory shock, mostly of septic origin, high renin concentration correlates with high circulating angiotensin I concentrations (30). However, this contrasts with normal or low circulating angiotensin II

concentrations (30,32), resulting in a high angiotensin I / angiotensin II ratio which has been associated with increased mortality (32).

All factors considered, the angiotensin I / angiotensin II ratio exhibits an inverse correlation with ACE activity (33). Consequently, the constataion of a high ratio in critically ill patients has led to the attribution of the observed alterations primarily to an ACE deficiency (30,32). Indeed, decreased ACE activity have been found in patients with acute lung injury, consistent with the dominant pulmonary expression of ACE and suggesting a predominant role of sepsis-associated (pulmonary) endotheliopathy (34–36). Additionally, impaired ACE activity could be linked to the presence of circulating ACE inhibitors (37,38). Importantly, a defect of ACE activity also leads to bradykinin accumulation, further worsening vasoplegia (33).

However, several mechanisms may be intertwined in RAAS alterations during septic shock (**Figure 4**). In addition to a decreased generation of angiotensin II, enhanced degradation of angiotensin II by peptidases; and/or the unavailability of AT1R could also contribute to defective signaling. Early experiments already demonstrated the progressive rise of plasma angiotensinase activity during endotoxemic shock, in dogs (39). To date, the majority of evidence pertains to increased concentration and activity of circulating DPP3. This enzyme hydrolyses angiotensin II but not angiotensin I, resulting in an elevated angiotensin I / angiotensin II ratio (40). Interestingly, both the baseline concentration and kinetics of circulating DPP3 are associated with outcome during sepsis (41,42). Other enzymes capable of degrading angiotensin II include ACE2. Notably, ACE2 exhibits a higher affinity for angiotensin II than angiotensin I thus, suggesting that an increase in ACE2 activity could theoretically lead to an elevated angiotensin I / angiotensin II ratio (43). However, no study has specifically investigated ACE2 activity in the context of human or experimental septic shock. Other angiotensin II-degrading enzymes may also be implicated such as prolyl oligopeptidase or prolyl carboxypeptidase (44). Additionally, it is worth noting that NEP cleaves angiotensin II and could theoretically by-pass ACE by generating angiotensin 1-7 from angiotensin I. Although the circulating concentration of NEP is increased in critically ill patients (45), such increase is not associated with prognosis, potentially because concentration and activity are dissociated during septic shock, likely due to endogenous inhibitors (46,47).

Finally, a reduced sensitivity to angiotensin II in septic shock models and patients compared to their healthy counterparts suggests a downstream defect. This impaired signaling could arise from AT1R unavailability, which may result from AT1R downregulation or reduced synthesis. The membrane localization of AT1R is known to be modulated by two associated proteins: the AT1R associated protein (ATRAP), which enhances AT1R internalization, and the AT1R

associated protein 1 (ARAP1), promoting the recycling of AT1R to the membrane (48,49). Interestingly, a single nucleotide polymorphism of ATRAP has been associated with increased ATRAP protein expression in vitro and with increased vasoplegia in patients, as demonstrated by decreased mean arterial pressure during sepsis and post-cardiac surgery (50). These findings are further linked to increased mortality of patients presenting such polymorphism during septic shock (50). Conversely, expression of ARAP1 is downregulated during experimental endotoxemia or after in vitro exposition to pro-inflammatory cytokines (51). Furthermore, experimental endotoxemia in *Arap1* knockout mice suggests that the downregulation of ARAP1 expression during sepsis contributes to the development of hypotension by reducing vascular sensitivity to angiotensin II (51). Additionally, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines may cooperate to decrease AT1R gene transcription (52,53). Micro-RNA-155, which is overexpressed in both animal and human sepsis, negatively regulates AT1R transcription, ultimately leading to decreased vasoconstrictive responses to angiotensin II (54).

Importantly, the growing utilization of RAAS inhibitors exposes patients to iatrogenic causes of defective AT1R signaling. For instance, the use of renin inhibitor or ACE inhibitors is likely to contribute to an insufficient generation of angiotensin II. Conversely, the use of an angiotensin receptor blocker reduces sensitivity to angiotensin II. It is worth noting that some of these medications have a prolonged half-life and are eliminated through the renal route, exposing patients to long-lasting alterations.

The aforementioned alterations can occur either in isolation or in combination, leading to an uncoupling between RAAS input (renine release) and output (AT1R stimulation). Intriguingly, evidence of such uncoupling can be found in situations of hyperreninemic hypoaldosteronism described several years ago in a subset of critically ill patients. These patients, despite consistently elevated plasma renin activity, exhibited abnormally normal or even low plasma aldosterone concentration. Notably, this profile was more frequently observed in septic shock patients and was associated with higher incidence of AKI as well as lower survival rates (55–57).

## RAAS-targeted therapy

The only RAAS targeted therapy that has advanced to clinical stages in shock is angiotensin II. In animal models of septic shock, vasopressor support with angiotensin II has been associated with similar systemic hemodynamics compared to norepinephrine (23,58). The use of angiotensin II in humans was initially limited to bovine angiotensin II in cases of refractory shock (59,60). The development of synthetic human angiotensin II allowed larger-scale evaluation.

The randomized controlled trial ATHOS-3 investigated the addition of angiotensin II or placebo in 344 patients with catecholamine-refractory vasodilatory shock, predominantly of septic origin (61). The primary end point, response with respect to mean arterial pressure at hour 3 after the start of infusion (a response was defined as an increase from baseline of at least 10 mm Hg or an increase to at least 75 mm Hg, without an increase in the dose of background vasopressors), was reached more often in patients randomized to angiotensin II, compared to those receiving placebo (69.9% vs 23.4%,  $p < 0.001$ ). However, there were no significant difference in secondary outcomes such as the mean change in SOFA score at hour 48, or mortality at day 7 or 28. Post-hoc analyses suggested that in patients with AKI requiring renal replacement therapy at study drug initiation, the rate of renal replacement therapy liberation and 28-day survival were greater in the angiotensin II group compared to the placebo group (62). Despite these interesting and biologically plausible findings, the post-hoc nature of the analysis and the absence of predefined criteria for initiating and discontinuing renal replacement therapy prevent definitive conclusions. Additionally, in patients with baseline renin concentration above the median of ATHOS-3 population, angiotensin II was associated with a significant reduction in 28-day mortality, compared to placebo (50.9% vs 69.9%,  $p = 0.012$ ), suggesting the potential use of renin as an enrichment biomarker in future trials. Despite these encouraging findings, it remains to be prospectively demonstrated that angiotensin II is associated with improved patients-centered outcomes such as survival. Additionally, several questions remain to be answered:

First, it is unclear whether angiotensin II should be administered in all patients with vasodilatory shock. Noticeably, the vasopressor response to angiotensin II is not constant in vasodilatory shock. In ATHOS-3, 30% of patients randomized to angiotensin II did not have a blood pressure response at hour-3 despite the use of large doses (up to 200 ng/kg/min) (61). Conversely, a hyper-response phenomenon has also been described (63–65). This diversity of response profile could mirror the diversity of RAAS alterations mechanisms described earlier.

According to this hypothesis, patients with an isolated angiotensin II generation defect would be likely to be hyper-responsive to exogenous angiotensin II. Conversely, high doses might not be sufficient in a patient with increased degradation of angiotensin II and/or AT1R downregulation. In these latter patients, alternative or complementary strategies might be necessary. Predictive biomarkers could potentially aid in personalizing therapy. Second, in ATHOS-3 80.7% of patients had a septic shock. Whether angiotensin II is of benefit in non-septic vasodilatory shock remain to be investigated. The molecular mechanisms underlying RAAS alterations have been primarily described in septic contexts, and the benefit-risk balance in non-septic situations such as severe pancreatitis, extensive burns or cardiac surgery may differ. Patients with recent cardiac injuries, may raise concerns, and dedicated studies are needed to assess the appropriateness of angiotensin II support in these cases. Third, in ATHOS-3, more than two thirds of subjects were receiving two or more vasopressors prior to study drug administration. Additional research is required to determine whether angiotensin II should be administered as the primary vasopressor or as a secondary or tertiary option. Evaluating the potential benefits of a primary balanced strategy combining norepinephrine, vasopressin, and angiotensin II should also be considered (66).

Finally, the adverse event profile needs further examination. While the rates of adverse events of special interest were similar between the angiotensin II and placebo groups in ATHOS-3, there was a higher incidence of combined arterial and venous thromboembolic events in patients receiving angiotensin II (61,67). This observation aligns with the known pro-thrombotic properties of angiotensin II and has led to recommendations for thromboembolism prophylaxis in patients treated with angiotensin II (68).

### **Future directions and recommendations for RAAS research**

We have attempted to synthesize the available translational evidence regarding RAAS alterations during septic shock, their consequences, and potential therapeutic strategies. Nevertheless, further investigation is warranted to gain a comprehensive understanding of RAAS alterations during septic shock. Notably, investigation of alternative RAAS components such as ACE2 and angiotensin 1-7 appear critical for unraveling the complex contribution of RAAS alterations to circulatory failure. Additionally, exploring the temporal aspects of RAAS alterations throughout the course of disease is essential to inform the selection of optimal therapeutic approaches at different stages of septic shock. Furthermore, a pressing need exists to identify distinct patient phenotypes based on RAAS alterations and translate this

understanding into personalized interventions. To achieve a comprehensive understanding of the RAAS in septic shock, rigorous research methodologies and adequate experimental models are indispensable. In this regard, several important points should be highlighted:

Renin measurement alone is insufficient to draw conclusion about the pathophysiological role of the RAAS in pathological situation. Indeed, high renin can result from appropriate feedback to an impaired AT1R signaling or from inappropriate activation of the RAAS leading to more inflammation, oxidative stress and intra-renal vasoconstriction (69). When the aim is to investigate the role of RAAS in a pathological condition, it is preferable to couple renin with RAAS peptides measurements and to assess their downstream clinical (e.g., systemic and renal hemodynamic) and biological (e.g., aldosterone secretion) effects.

Measuring RAAS peptides is challenging and necessitates validated and reproducible methodology. Such measurements face multiple obstacles including short half-life, low concentrations, and high sequence similarity of RAAS peptides as well as ex-vivo generation from circulating angiotensinogen and renin. These pitfalls might be adequately addressed by sampling on tubes pre-filled with peptidases inhibitors and by the use of modern measurements methods such as mass spectrometry or immunoassays coupled with liquid chromatography (70).

To gain a better understanding of the precise mechanism underlying a potential benefit of RAAS modulation, it is desirable to study not only the initial RAAS picture during shock, but also how a specific intervention modifies the system. For instance, the benefits associated with angiotensin II administration may extend beyond the directly observable AT1R-mediated hemodynamic effects, involving additional mechanisms. Negative feedback on renin secretion could reduce pro-inflammatory effects mediated by renin via the PRR (71–73). Other AT1R-mediated immune effects could participate in pathogen clearance during sepsis (74). Additionally, exogenous angiotensin II could exert beneficial effects directly through the AT2R receptor or after in vivo conversion into alternative RAAS peptides or alatensins (75).

The translation of observations obtained in animal studies to humans must be done cautiously, given numerous inter-species variations (76). Therefore, whenever possible, these observations should be validated in several species and, at best, in humans.

From a clinical perspective, the short-term benefit of RAAS modulation should not overshadow the potential long-term side effects associated with the well-established AT1R-mediated pro-inflammatory and pro-fibrosis effects. Therefore, especially when planning human trials, long-term follow-up with vigilant monitoring for adverse cardiovascular and/or renal events is advisable.

## **Conclusion**

While the RAAS is crucial to cope with circulatory stress, alterations of this homeostatic system have been recently demonstrated during septic shock. These observations open a new field of research and hopefully new therapeutic avenues susceptible to improve patients' prognosis. In the next future, a better understanding of RAAS alterations should help to decipher patients' phenotypes and translate into targeted interventions.

## 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 Feb 23;315(8):801–10.
2. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021 Nov;47(11):1181–247.
3. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1996 Mar;27(3 Pt 2):465–75.
4. Jan Danser AH, Batenburg WW, van Esch JHM. Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007 May;22(5):1288–92.
5. Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*. 1967 Nov 25;216(5117):762–6.
6. Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2006 Oct;188(2):129–38.
7. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):48623–6.
8. Le MT, Vanderheyden PML, Szaszák M, Hunyady L, Vauquelin G. Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23107–10.
9. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2014 Jun;63(6):1138–47.
10. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, et al. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Feb;27(2):297–302.
11. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013 Apr 12;112(8):1104–11.
12. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019 May 1;316(5):H958–70.

13. Christen Y, Waeber B, Nussberger J, Porchet M, Borland RM, Lee RJ, et al. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation*. 1991 Apr;83(4):1333–42.
14. Kiowski W, Linder L, Kleinbloesem C, van Brummelen P, Bühler FR. Blood pressure control by the renin-angiotensin system in normotensive subjects. Assessment by angiotensin converting enzyme and renin inhibition. *Circulation*. 1992 Jan;85(1):1–8.
15. Posternak L, Brunner HR, Gavras H, Brunner DB. Angiotensin II blockade in normal man: interaction of renin and sodium in maintaining blood pressure. *Kidney Int*. 1977 Mar;11(3):197–203.
16. Roshanov PS, Rochweg B, Patel A, Salehian O, Duceppe E, Belley-Côté EP, et al. Withholding versus Continuing Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II Receptor Blockers before Noncardiac Surgery: An Analysis of the Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluationN Prospective Cohort. *Anesthesiology*. 2017 Jan;126(1):16–27.
17. Carp H, Vadhera R, Jayaram A, Garvey D. Endogenous vasopressin and renin-angiotensin systems support blood pressure after epidural block in humans. *Anesthesiology*. 1994 May;80(5):1000–7; discussion 27A-28A.
18. Seidelin PH, Coutie WJ, Pai MS, Morton JJ, Struthers AD. The interaction between noradrenaline and angiotensin II in man: evidence for a postsynaptic and against a presynaptic interaction. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 1987 Dec;5(5):S121-124.
19. Hidaka T, Tsuneyoshi I, Boyle WA, Onomoto M, Yonetani S, Hamasaki J, et al. Marked synergism between vasopressin and angiotensin II in a human isolated artery. *Crit Care Med*. 2005 Nov;33(11):2613–20.
20. Hall JE, Coleman TG, Guyton AC, Kastner PR, Granger JP. Control of glomerular filtration rate by circulating angiotensin II. *Am J Physiol*. 1981 Sep;241(3):R190-197.
21. Burnier M, Waeber B, Brunner HR. Clinical pharmacology of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium in healthy subjects. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 1995 Jul;13(1):S23-28.
22. Schnermann J, Huang YG, Briggs JP. Angiotensin II blockade causes acute renal failure in eNOS-deficient mice. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. 2001 Mar;2(1\_suppl):S199–203.

23. Corrêa TD, Jeger V, Pereira AJ, Takala J, Djafarzadeh S, Jakob SM. Angiotensin II in septic shock: effects on tissue perfusion, organ function, and mitochondrial respiration in a porcine model of fecal peritonitis. *Crit Care Med*. 2014 Aug;42(8):e550-559.
24. Leisman DE, Fernandes TD, Bijol V, Abraham MN, Lehman JR, Taylor MD, et al. Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2020 Aug 31;
25. Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2007 Sep;33(9):1614–8.
26. Wan L, Langenberg C, Bellomo R, May CN. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2009;13(6):R190.
27. Casellas D, Mimran A. Shunting in renal microvasculature of the rat: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Anat Rec*. 1981 Oct;201(2):237–48.
28. Langenberg C, Gobe G, Hood S, May CN, Bellomo R. Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. *Crit Care Med*. 2014 Jan;42(1):e58-67.
29. Gleeson PJ, Crippa IA, Mongkolpun W, Cavicchi FZ, Van Meerhaeghe T, Brimiouille S, et al. Renin as a Marker of Tissue-Perfusion and Prognosis in Critically Ill Patients. *Crit Care Med*. 2019 Feb;47(2):152–8.
30. 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. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jul 1;
31. Flannery AH, Ortiz-Soriano V, Li X, Gianella FG, Toto RD, Moe OW, et al. Serum renin and major adverse kidney events in critically ill patients: a multicenter prospective study. *Crit Care Lond Engl*. 2021 Aug 14;25(1):294.
32. Bellomo R, Wunderink RG, Szerlip H, English SW, Busse LW, Deane AM, et al. Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. *Crit Care Lond Engl*. 2020 06;24(1):43.
33. Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1994 Apr;23(4):439–49.
34. Casey L, Krieger B, Kohler J, Rice C, Oparil S, Szidon P. Decreased serum angiotensin converting enzyme in adult respiratory distress syndrome associated with sepsis: a preliminary report. *Crit Care Med*. 1981 Sep;9(9):651–4.
35. Müller AM, Gruhn KM, Herwig MC, Tsokos M. VE-cadherin and ACE: markers for sepsis in post mortem examination? *Leg Med Tokyo Jpn*. 2008 Sep;10(5):257–63.

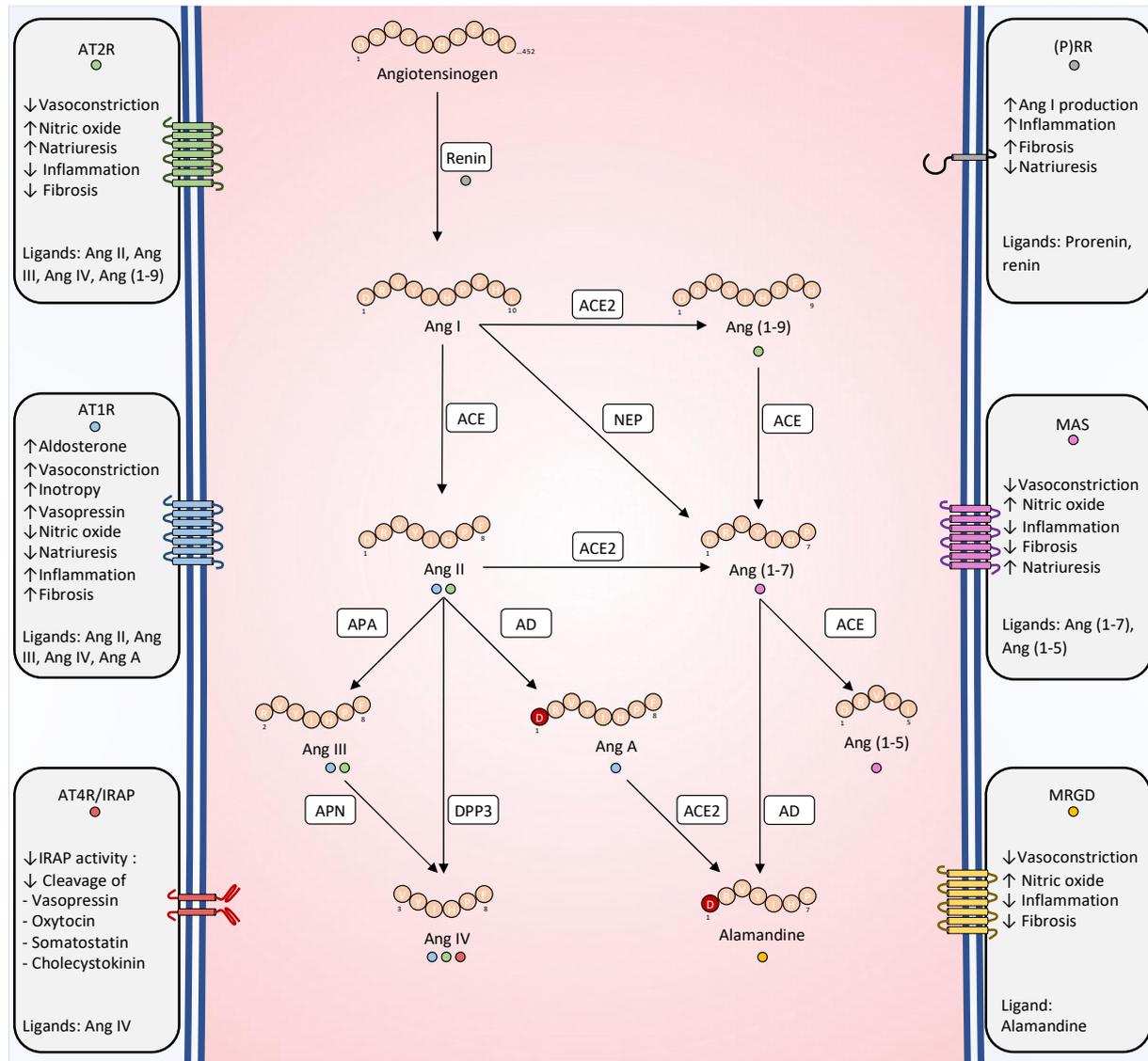
36. Kaziani K, Vassiliou AG, Kotanidou A, Athanasiou C, Korovesi I, Glynos K, et al. Activated Protein C has No Effect on Pulmonary Capillary Endothelial Function in Septic Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: Association of Endothelial Dysfunction with Mortality. *Infect Dis Ther*. 2018 Mar;7(Suppl 1):15–25.
37. Krenn K, Höbart P, Poglitsch M, Croizé A, Ullrich R. Equilibrium Angiotensin Metabolite Profiling in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome Indicates Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Nov 15;202(10):1468–71.
38. Pode-Shakked N, Ceschia G, Rose JE, Goldstein SL, Stanski NL, Genomics of Pediatric Septic Shock Investigators. Increasing angiotensin-converting enzyme concentrations and absent angiotensin-converting enzyme activity are associated with adverse kidney outcomes in pediatric septic shock. *Crit Care Lond Engl*. 2023 Jun 12;27(1):230.
39. Itskovitz HD, Miller L, Ural W, Zapp J, White R. Inactivation of angiotensin in shock. *Am J Physiol*. 1969 Jan;216(1):5–10.
40. Picod A, Deniau B, Vaittinada Ayar P, Genest M, Julian N, Azibani F, et al. Alteration of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Shock: Role of the Dipeptidyl Peptidase 3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Feb 15;203(4):526–7.
41. Blet A, Deniau B, Santos K, van Lier DPT, Azibani F, Wittebole X, et al. Monitoring circulating dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) predicts improvement of organ failure and survival in sepsis: a prospective observational multinational study. *Crit Care Lond Engl*. 2021 Feb 15;25(1):61.
42. Deniau B, Picod A, Van Lier D, Vaittinada Ayar P, Santos K, Hartmann O, et al. High plasma dipeptidyl peptidase 3 levels are associated with mortality and organ failure in shock: results from the international, prospective and observational FROG-ICU cohort. *Br J Anaesth*. 2022 Feb;128(2):e54–7.
43. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 2004 Oct 1;383(Pt 1):45–51.
44. Vliegen G, Kehoe K, Bracke A, De Hert E, Verkerk R, Fransen E, et al. Dysregulated activities of proline-specific enzymes in septic shock patients (sepsis-2). *PLoS One*. 2020;15(4):e0231555.
45. Lenz M, Krychtiuk KA, Brekalo M, Draxler DF, Pavo N, Hengstenberg C, et al. Soluble neprilysin and survival in critically ill patients. *ESC Heart Fail*. 2022 Apr;9(2):1160–6.

46. Pirracchio R, Deye N, Lukaszewicz AC, Mebazaa A, Cholley B, Matéo J, et al. Impaired plasma B-type natriuretic peptide clearance in human septic shock. *Crit Care Med*. 2008 Sep;36(9):2542–6.
47. Vodovar N, Séronde MF, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Januzzi JL, et al. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2015 Aug;3(8):629–36.
48. Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec;14(12):5038–50.
49. Guo DF, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T. Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 31;310(4):1254–65.
50. Nakada T aki, Russell JA, Boyd JH, McLaughlin L, Nakada E, Thair SA, et al. Association of angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene polymorphism with increased mortality in septic shock. *Crit Care Med*. 2011 Jul;39(7):1641–8.
51. Mederle K, Schweda F, Kattler V, Doblinger E, Miyata K, Höcherl K, et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit Care Lond Engl*. 2013 Jul 11;17(4):R130.
52. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2001 Aug;38(2):177–82.
53. Schmidt C, Höcherl K, Kurt B, Moritz S, Kurtz A, Bucher M. Blockade of multiple but not single cytokines abrogates downregulation of angiotensin II type-I receptors and anticipates septic shock. *Cytokine*. 2010 Jan;49(1):30–8.
54. Vasques-Nóvoa F, Laundos TL, Cerqueira RJ, Quina-Rodrigues C, Soares-Dos-Reis R, Baganha F, et al. MicroRNA-155 Amplifies Nitric Oxide/cGMP Signaling and Impairs Vascular Angiotensin II Reactivity in Septic Shock. *Crit Care Med*. 2018 Sep;46(9):e945–54.
55. Zipser RD, Davenport MW, Martin KL, Tuck ML, Warner NE, Swinney RR, et al. Hyperreninemic hypoaldosteronism in the critically ill: a new entity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981 Oct;53(4):867–73.
56. Findling JW, Waters VO, Raff H. The dissociation of renin and aldosterone during critical illness. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Mar;64(3):592–5.
57. 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.

58. Garcia B, Su F, Dewachter L, Favory R, Khaldi A, Moiroux-Sahraoui A, et al. Myocardial effects of angiotensin II compared to norepinephrine in an animal model of septic shock. *Crit Care Lond Engl*. 2022 Sep 18;26(1):281.
59. Del Greco F, Johnson DC. Clinical experience with angiotensin II in the treatment of shock. *JAMA*. 1961 Dec 9;178:994–9.
60. Derrick JR, Anderson JR, Roland BJ. Adjunctive use of a biologic pressor agent, angiotensin, in management of shock. *Circulation*. 1962 Jan;25:263–7.
61. Khanna A, English SW, Wang XS, Ham K, Tumlin J, Szerlip H, et al. Angiotensin II for the Treatment of Vasodilatory Shock. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):419–30.
62. 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 Jun;46(6):949–57.
63. Chawla LS, Busse L, Brasha-Mitchell E, Davison D, Honiq J, Alotaibi Z, et al. Intravenous angiotensin II for the treatment of high-output shock (ATHOS trial): a pilot study. *Crit Care Lond Engl*. 2014 Oct 6;18(5):534.
64. Chawla LS, Busse LW, Brasha-Mitchell E, Alotaibi Z. The use of angiotensin II in distributive shock. *Crit Care Lond Engl*. 2016 May 27;20(1):137.
65. Ham KR, Boldt DW, McCurdy MT, Busse LW, Favory R, Gong MN, et al. Sensitivity to angiotensin II dose in patients with vasodilatory shock: a prespecified analysis of the ATHOS-3 trial. *Ann Intensive Care*. 2019 Jun 3;9(1):63.
66. Chawla LS, Ostermann M, Forni L, Tidmarsh GF. Broad spectrum vasopressors: a new approach to the initial management of septic shock? *Crit Care Lond Engl*. 2019 Apr 16;23(1):124.
67. Farina N, Bixby A, Alaniz C. Angiotensin II Brings More Questions Than Answers. *P T Peer-Rev J Formul Manag*. 2018 Nov;43(11):685–7.
68. La Jolla Pharmaceutical Company. GIAPREZA (angiotensin II) package insert. 2018;
69. Legrand M, Bokoch MP. The Yin and Yang of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Acute Kidney Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 May 1;203(9):1053–5.
70. Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H137-152.
71. Narumi K, Hirose T, Sato E, Mori T, Kisu K, Ishikawa M, et al. A functional (pro)renin receptor is expressed in human lymphocytes and monocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Mar 1;308(5):F487-499.

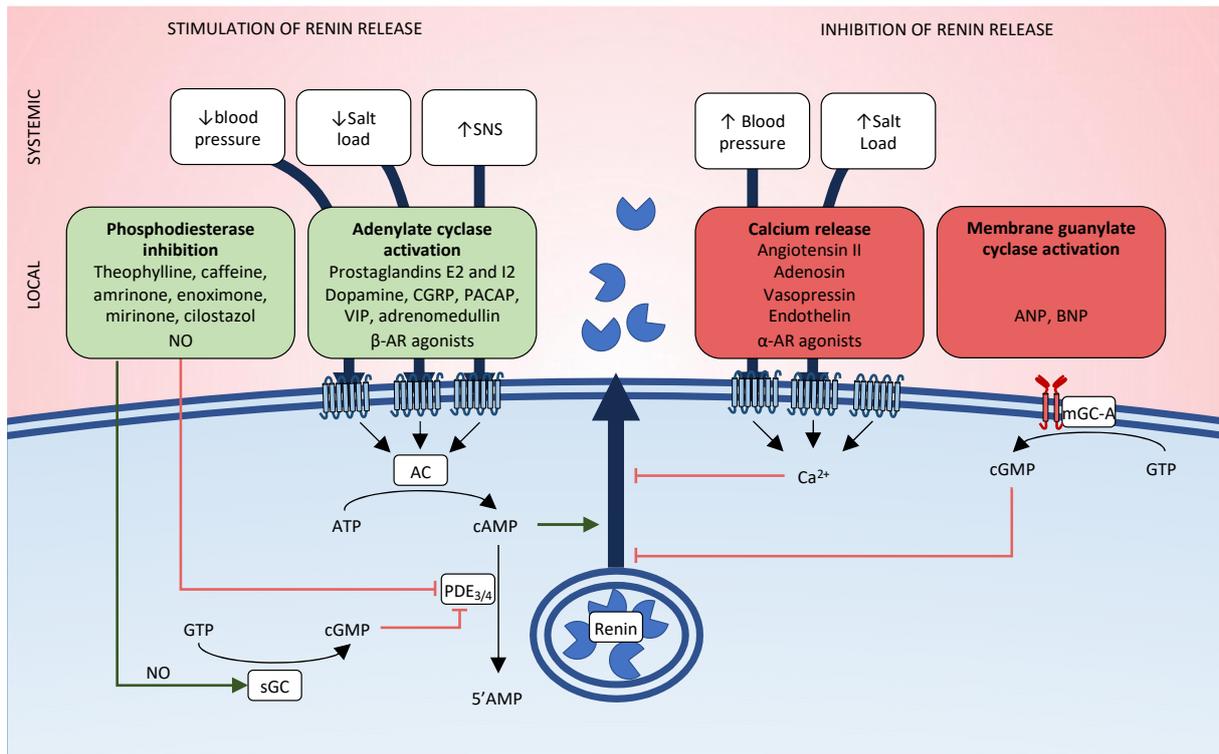
72. Véniant M, Ménard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins J. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest*. 1996 Nov 1;98(9):1966–70.
73. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(1):105–13.
74. Leisman DE, Privratsky JR, Lehman JR, Abraham MN, Yaipan OY, Brewer MR, et al. Angiotensin II enhances bacterial clearance via myeloid signaling in a murine sepsis model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Aug 23;119(34):e2211370119.
75. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*. 2008 Dec 9;118(24):2523–32.
76. Hollenberg NK. Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):150–4.

## Figures and tables



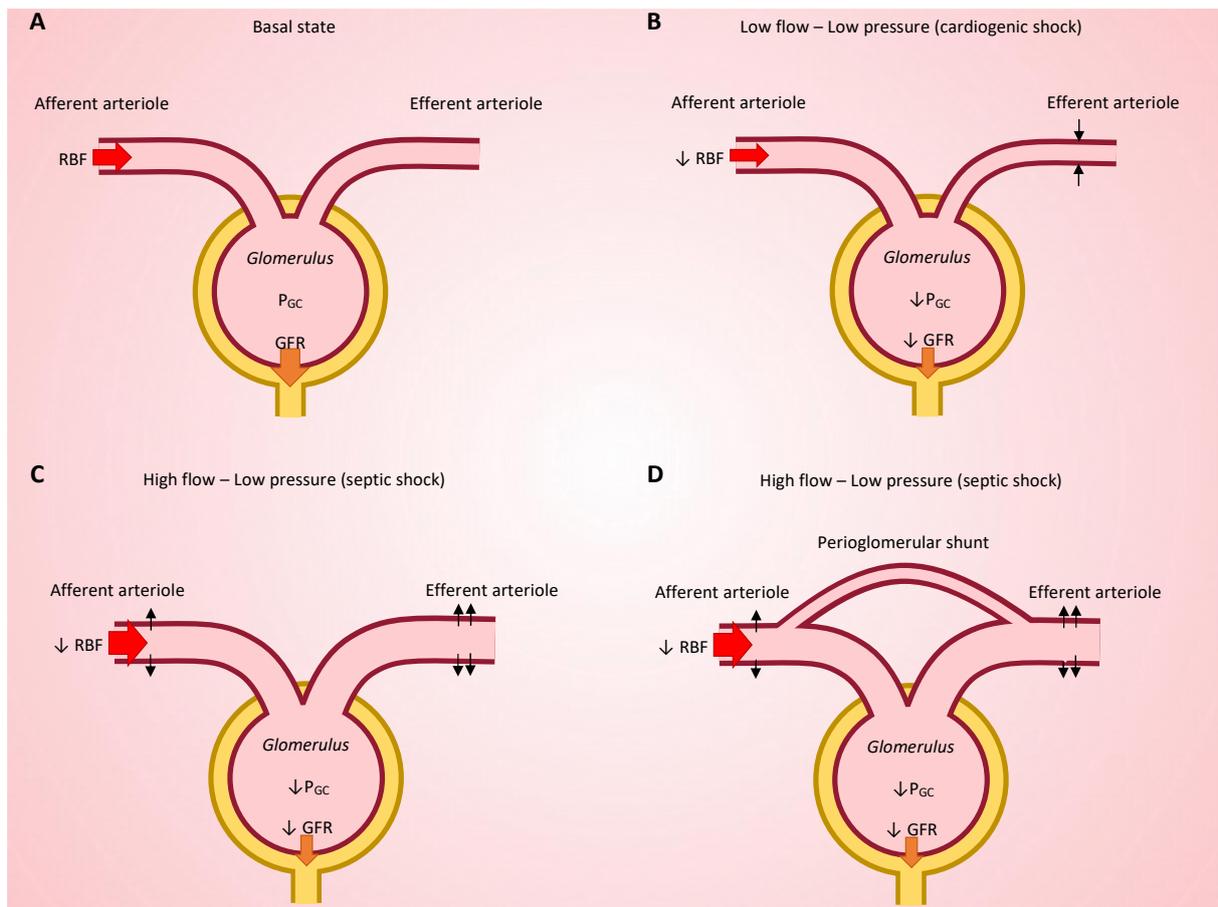
**Figure 1. Overview of the RAAS.**

All angiotensin peptides originate from the sequential proteolytic cleavage of angiotensinogen. For clarity, only peptides with a firmly established biological function are depicted. The interactions of a given peptide with its receptor(s) are illustrated by the color-coded dot(s): blue (AT1R), green (AT2R), red (AT4R/IRAP), gray (PRR), purple (MAS) or yellow (MRGD). In addition to the ligand-receptor interactions depicted, a potential binding of Ang 1-7 to AT1R at elevated concentrations has been reported, although the biological significance of this interaction remains uncertain. Ang: angiotensin, ACE: angiotensin-converting enzyme, ACE2: angiotensin-converting enzyme 2, NEP: neprilysin, DPP3: dipeptidyl peptidase 3, APA: aminopeptidase A, APN: aminopeptidase N, AD: aspartate decarboxylase. (P)RR: (pro-)renin receptor, AT1R: angiotensin II, type 1 receptor, AT2R: angiotensin II, type 2 receptor, AT4R: angiotensin IV receptor; MRGD: MAS-related G-protein-coupled D receptor.



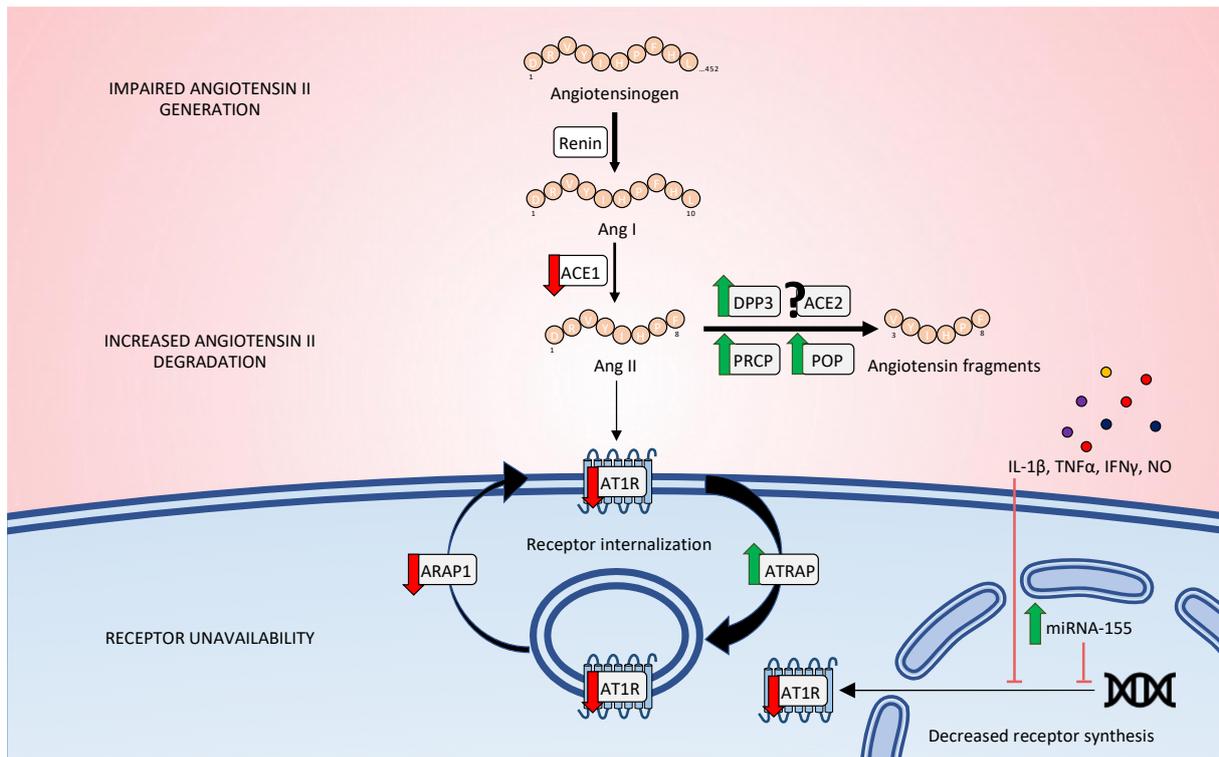
**Figure 2. Regulation of renin secretion**

Juxtaglomerular cells release renin through exocytosis in response to various stimuli. Systemic factors such as blood pressure, salt intake, and activation of the sympathetic nervous system exert their effects, in part, through the mediators described here. At the cellular level, all molecular mediators that stimulate renin release do so by elevating intracellular cAMP concentration. Conversely, any stimuli associated with intracellular calcium accumulation inhibit renin release. cGMP can either stimulate or inhibit renin secretion depending on its mode of production. Activation of sGC by NO inhibits PDE3 and thus stimulates renin release through cAMP accumulation. Conversely, activation of mGC-A by ANP or BNP inhibits renin release. SNS: sympathetic nervous system, NO: nitric oxide, AC: adenylate cyclase, mGC-A: membrane guanylate cyclase A, sGC: soluble guanylate cyclase, PDE3/4: phosphodiesterase 3/4, ATP: adenosine triphosphate, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, GTP: guanosine triphosphate, cGMP: cyclic guanosine monophosphate.



**Figure 3. Glomerular hemodynamics in health and circulatory failure.**

Basal state (A). During circulatory failure characterized by low cardiac output (e.g., cardiogenic shock), reflex myogenic vasodilation of the afferent arteriole and vasoconstriction of the efferent arteriole tend to maintain  $P_{GC}$  and therefore GFR. When these mechanisms are insufficient to maintain an adequate  $P_{GC}$ , GFR falls down (B). Conversely, during vasodilatory shock with high cardiac output (e.g., septic shock), preferential vasodilation of the efferent arteriole could explain the fall in  $P_{GC}$  and therefore GFR decrease despite a high RBF (C). Additionally, reopening of peri-glomerular shunts could participate in the RBF – GFR decoupling observed during sepsis-associated acute kidney injury (D). RBF: renal blood flow,  $P_{GC}$ : Glomerular capillary pressure, GFR: Glomerular filtration rate.



**Figure 4. Mechanisms of impaired Ang II – AT1R signaling in septic shock.**

Impaired angiotensin II – AT1R signaling occur at multiple levels, including: 1. Impaired generation of angiotensin II, possibly attributable to defects in angiotensin-converting enzyme activity; 2. Enhanced degradation of angiotensin II by peptidases such as circulating DPP3, POP or PRCP; and/or 3. Unavailability of the AT1R receptor due to internalization or reduced synthesis under the influence of pro-inflammatory cytokines, NO or miRNA-155. Importantly, the angiotensin fragments that originate from angiotensin II cleavage could also mediate their own biological effects (e.g., angiotensin (1-7) via ACE2, POP or PRCP; angiotensin IV via DPP3). ACE: angiotensin-converting enzyme. DPP3: dipeptidyl peptidase 3, ACE2: angiotensin-converting enzyme 2, POP: prolyl oligopeptidase, PRCP: prolyl carboxypeptidase, AT1R: angiotensin II, type 1 receptor, ARAP1: AT1R-associated protein 1, ATRAP: AT1R-associated protein. IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ , IFN: interferon  $\gamma$ , NO: nitric oxide.

## Annexe 2. The CLIP-based mortality score in cardiogenic shock: suitable only for cardiogenic shock?

Correspondance publiée dans l'European Journal of Heart Failure.



results in single centre trials, such indices have failed to distinguish themselves in larger trials. A main reason of this phenomenon is that these indices present high inter-observer variability and ultimately fail to dissociate accurately responders and non-responders to CRT before implantation.<sup>6,7</sup>

Our study presented limitations. Patients' sample was tight, factors influencing CRT response such as presence of scar and lead placement were not assessed and response criterion was based solely upon LVESV reduction. A limitation of the use of echocardiography to determine VAC is that the volume-axis intercept is assumed to be negligible in comparison to LVESV.<sup>4</sup> Still, in our study, response to CRT rate was in concordance with larger randomized trials and patients' characteristics resemble most closely daily practice.<sup>6,7</sup>

Our work suggests that measurement of VAC markers such as Ea/Ees or cPWV/GLS in addition to standard CRT implantation criteria may provide incremental benefit and these findings should be evaluated in larger randomized studies.

**Conflict of interest:** none declared.

**Nikolaos Karamichalakis<sup>1\*</sup>,  
Ignatios Ikonomidis<sup>2</sup>, John Parisis<sup>2</sup>,  
Panagiotis Simitsis<sup>2</sup>, and  
Gerasimos Filippatos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>6th Cardiology Department, Hygeia Hospital, Athens, Greece; and <sup>2</sup>2nd Cardiology Department, Attikon Hospital, University of Athens, Athens, Greece

\*Email: karamichalakisnick@outlook.com

### References

1. Akar JG, Al-Chekakie MO, Fugate T, Moran L, Frol-oshki B, Varma N, Santucci P, Wilber DJ, Matsumura ME. Endothelial dysfunction in heart failure identifies responders to cardiac resynchronization therapy. *Heart Rhythm* 2008;5:1229–1235.
2. Warriner DR, Lawford P, Sheridan PJ. Measures of endothelial dysfunction predict response to cardiac resynchronisation therapy. *Open Heart* 2016;3:e000391.
3. Ajaero CN, Procter NEK, Chirkov YY, Heresztyn T, Arstall MA, McGavigan AD, Frenneaux MP, Horowitz JD. Endothelial dysfunction and glycocalyx shedding in heart failure: insights from patients receiving cardiac resynchronisation therapy. *Heart Vessels* 2020;35:197–206.
4. Ikonomidis I, Aboyans V, Blacher J, Brodmann M, Brutsaert DL, Chirinos JA, De Carlo M, Delgado V, Lancellotti P, Lekakis J, Mohty D, Nihoyannopoulos P, Parisis J, Rizzoni D, Ruschitzka F, Seferovic P, Stabile E, Tousoulis D, Vinereanu D, Vlachopoulos C, Vlastos D, Xaplanteris P, Zimlichman R, Metra M. The role of ventricular-arterial coupling in cardiac disease and heart failure: assessment, clinical implications and therapeutic interventions. A consensus document of the European Society of

Cardiology Working Group on Aorta & Peripheral Vascular Diseases, European Association of Cardiovascular Imaging, and Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail* 2019;21:402–424.

5. Zanon F, Aggio S, Baracca E, Pastore G, Corbucci G, Boaretto G, Braggion G, Piergentili C, Rigatelli G, Roncon L. Ventricular-arterial coupling in patients with heart failure treated with cardiac resynchronization therapy: may we predict the long-term clinical response? *Eur J Echocardiogr* 2009;10:106–111.
6. Bax JJ, Gorcsan J 3rd. Echocardiography and noninvasive imaging in cardiac resynchronization therapy: results of the PROSPECT (Predictors of Response to Cardiac Resynchronization Therapy) study in perspective. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1933–1943.
7. Breitenstein A, Steffel J. Devices in heart failure patients-who benefits from ICD and CRT? *Front Cardiovasc Med* 2019;6:111.
8. Zócalo Y, Bia D, Armentano RL, González-Moreno J, Varela G, Calleriza F, Reyes-Caorsi VV. Resynchronization improves heart-arterial coupling reducing arterial load determinants. *Europace* 2013;15:554–565.

doi:10.1002/ejhf.2208  
Online publish-ahead-of-print 18 May 2021

### The CLIP-based mortality score in cardiogenic shock: suitable only for cardiogenic shock?

We read with interest the article by Ceglarek et al.<sup>1</sup> recently published in the *European Heart Journal*. The authors described, from a prospective cohort including 458 patients admitted for cardiogenic shock (CS) complicating acute myocardial infarction (AMI), a new routinely available biomarker-based risk score called CLIP score [acronym of cystatin C, lactate, interleukin-6 and N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) dosed at admission] for 30-day mortality prediction in CS patients. Internally (from the CULPRIT-SHOCK trial) and externally validated (from the IABP-SHOCK II trial), the CLIP score was developed to improve early risk stratification of patients admitted for CS secondary to AMI, and it includes the prognostically most important biomarkers selected by a penalized multivariable logistic regression technique (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator, LASSO). The CLIP score yielded a c-statistics for 30-day mortality of 0.82 [95% confidence interval (CI) 0.78–0.86] in internal (n = 458), 0.82 (95% CI 0.75–0.89) in internal-external validation (n = 152) and 0.73 (95% CI 0.65–0.81) in external validation (n = 163). According to the authors, the main interest of this score is that each biomarker explores a complex

part of the pathophysiology of CS related to AMI (lactate for global tissue hypoxaemia, NT-proBNP as a marker of cardiac wall stress in congestive heart failure, interleukin-6 as a proinflammatory cytokine, and cystatin C as a parameter of renal function and potential inflammatory biomarker), thus explaining the rationale for using the CLIP score in CS related to AMI. Despite existing risk stratification scores (with clinical and biological items) in CS, namely the CardShock<sup>2</sup> and IABP-SHOCK II scores,<sup>3</sup> the authors developed this new score.

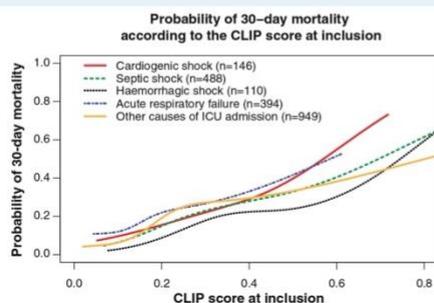
FROG-ICU (French and European Outcome Registry in Intensive Care Unit, NCT01367093) is an international, multicentre, observational cohort study previously described<sup>4</sup> including consecutive patients admitted to intensive care unit (ICU) for severe diseases, mainly CS, septic shock, haemorrhagic shock and acute respiratory failure, and followed up during 1 year after hospital discharge. The study was conducted in accordance with Good Clinical Practice and Helsinki Declaration, and Ethics Committee approval (Comité de Protection des Personnes – IRB n. 00003835 and IRB n. B403201213352) was obtained as per the French law.<sup>5</sup> Patients were included from August 2011 to June 2013. By applying the formula given by Ceglarek et al. based on the dosage of cystatin C, lactate, interleukin-6 and NT-proBNP at inclusion, we aimed to test the ability of the CLIP score to predict the 30-day mortality from main causes of ICU admission by calculating the area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic analysis (ROC). Comparisons of AUC were assessed using DeLong's method. In addition, we assessed the 30-day mortality probability according to CLIP score values at inclusion, for each cause of admission. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). Categorical variables were expressed as counts and percentages. A P-value < 0.05 was considered statistically significant.

In conclusion, the CLIP score is an easy, reliable and reproducible score. During the study period, 2087 patients, mainly men (n = 1361, 65%), with a median age of 63 (IQR 51–74) years, were included for CS (n = 146, 7%), septic shock (n = 488, 23%), haemorrhagic shock (n = 110, 5%) and acute respiratory failure (n = 394, 19%). Other causes of ICU admission were cardiac arrest (n = 179, 8.6%), traumatic brain injury (n = 286, 13.7%), post-operative management (n = 207, 9.9%), traumatism (n = 89, 4.3%), liver (n = 25, 1.2%) and kidney failure (n = 17,

**Table 1** Area under the curve for the CLIP score calculated at inclusion according to the cause of admission in intensive care unit

	Patients, n	AUC (95% CI)
Overall population	2087	0.72 (0.70–0.75)
Haemorrhagic shock	110	0.78 (0.67–0.71)
Septic shock	488	0.72 (0.67–0.78)
Cardiogenic shock	146	0.76 (0.66–0.86)
Acute respiratory failure	394	0.69 (0.61–0.76)
Other causes of ICU admission	949	0.73 (0.69–0.78)

AUC, area under the curve; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit.

**Figure 1** Probability of 30-day mortality according to the CLIP score calculated at inclusion in the FROG-ICU study depending on the cause of admission in intensive care unit (ICU).

0.8%), and others ( $n = 146$ , 6.9%). The overall 30-day mortality was 21% ( $n = 443$ ). Thirty-day mortality rates for septic shock, CS, haemorrhagic shock, acute respiratory failure and other causes of ICU admission were 26% ( $n = 129$ ), 24% ( $n = 35$ ), 24% ( $n = 26$ ), 21% ( $n = 83$ ) and 17.9% ( $n = 170$ ), respectively. Table 1 summarizes, for each cause of admission, AUC of ROC curves. Interestingly, the AUC of 30-day mortality with the CLIP score calculated at inclusion for acute respiratory failure [0.69 (0.61–0.76),  $P > 0.05$ ], haemorrhagic shock [0.78 (0.67–0.71),  $P > 0.05$ ], septic shock [0.72 (0.67–0.78),  $P > 0.05$ ] and other causes of ICU admission [0.73 (0.69–0.78),  $P > 0.05$ ]. The probability of 30-day mortality based on the CLIP score at inclusion according to the cause of admission is depicted in Figure 1. Regardless of the ICU cause of admission, the higher the CLIP score at admission, the higher the 30-day mortality without differences between causes of admission ( $P > 0.05$ ).

© 2021 European Society of Cardiology.

Our data show that the CLIP score, a new risk stratification score based on routine biomarker dosage at admission initially developed in CS related to AMI, was associated with 30-day mortality regardless of the ICU cause of admission. Indeed, biomarkers used to build the CLIP score are not specific of CS and/or AMI and reflect an inflammatory state (for interleukin-6 and cystatin C), global tissue hypoxemia (lactate) and organ injury (cystatin C for the kidney, NT-proBNP for congestive heart failure). Of interest, lactate (the more unspecific biomarker included in the CLIP score) affected the most the prediction. Such mechanisms are likely involved in most critically ill patients, regardless of the cause of admission. Other clinically and biologically relevant scores, namely the CardShock score<sup>2</sup> and IABP-SHOCK II score,<sup>3</sup> are available for risk stratification and prediction of short-term mortality specifically in patients admitted for CS (related to AMI or not) with a good performance.<sup>6</sup> However, although there was no significant difference in the AUC of the CLIP score

at ICU admission according to pathology, a large variability in AUC (0.69–0.78) was observed. This may be related to the lack of sensitivity of the method comparing AUCs, especially in case of small numbers of patients by subgroups or low number of events. Future studies are needed to better evaluate the precise role of these scores in severe patients.

useful for prediction of 30-day mortality, initially described in CS related to AMI as presented by Ceglarek *et al.*,<sup>1</sup> but unspecific as to the ICU cause at admission and therefore applicable to all ICU patients.

#### Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Marie-Céline Fournier who coordinated organizational aspects of the study. They also thank the Centre de Recherche Clinique (CRC) of Lariboisière University Hospital for support.

**Conflict of interest:** E.G. received research grant from Sphingotec, and consultancy fees from Magnisense and Roche Diagnostics. A.M. received speaker's honoraria from Abbott, Novartis, Orion, Roche and Servier, and fees as a member of the advisory board and/or steering committee from Cardiorentis, Adrenomed, MyCartis, Neurotronik and Sphingotec. B.D. and A.B. were invited in meeting in Henningsdorf by 4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH. All other authors have nothing to disclose.

**Benjamin Deniau**<sup>1,2,3</sup>, **Adrien Picot**<sup>1,2</sup>, **Feriel Azibani**<sup>2</sup>, **Etienne Gayat**<sup>1,2,3</sup>, **Alexandre Mebazaa**<sup>1,2,3\*</sup>, and **Alice Blet**<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesia, Burn and Critical Care, University Hospitals

Saint-Louis—Lariboisière, AP-HP, Paris, France;

<sup>2</sup>UMR-S 942, INSERM, MASCOT, Paris University, Paris, France; and <sup>3</sup>Université de Paris, Paris, France

\*Email: alexandre.mebazaa@aphp.fr

#### References

- Ceglarek U, Schellong P, Rosolowski M, Scholz M, Willenberg A, Kratzsch J, Zeymer U, Fuernau G, de Waha-Thiele S, Büttner P, Jobs A, Freund A, Desch S, Feistritz H, Isermann B, Thiery J, Pöss J, Thiele H. The novel cystatin C, lactate, interleukin-6, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (CLIP)-based mortality risk score in cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2021;42:2344–2352.
- Harjola VP, Lassus J, Sionis A, Kober L, Tarvasmäki T, Spinar J, Parissis J, Banaszewski M, Silva-Cardoso J, Carubelli V, Di Somma S, Tolppanen H, Zeymer U, Thiele H, Nieminen MS, Mebazaa A; CardShock Study Investigators,

- GREAT Network. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2015;17:501–509.
- Pöss J, Köster J, Fuernau G, Eitel I, de Waha S, Ouarak T, Lassus J, Harjola V-P, Zeymer U, Thiele H, Desch S. Risk stratification for patients in cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:1913–1920.
  - Gayat E, Cariou A, Deye N, Vieillard-Baron A, Jaber S, Damoise C, Lu Q, Monnet X, Renault I, Azoulay E, Léone M, Oueslati H, Guidet B, Friedman D, Tesnière A, Sonnevile R, Montravers P, Pili-Floury S, Lefrant JY, Duranteau J, Laterre PF, Brechot N, Chevreul K, Michel M, Chollet B, Legrand M, Launay JM, Vicaut E, Singer M, Resche-Rigon M, Mebazaa A. Determinants of long-term outcome in ICU survivors: results from the FROG-ICU study. *Crit Care* 2018; 22:8.
  - Toulouse E, Lafont B, Granier S, Mcgurk G, Bazin JE. French legal approach to patient consent in clinical research. *Anaesth Crit Care Pain Med* 2020;39:883–885.
  - Miller RJ, Southern D, Wilton SB, James MT, Har B, Schnell G, van Diepen S, Grant AD. Comparative prognostic accuracy of risk prediction models for cardiogenic shock. *J Intensive Care Med* 2020;35:1513–1519.

doi:10.1002/ehf.2247

Online publish-ahead-of-print 17 June 2021

### Prevalence and outcome of patients with acute myocarditis and positive viral search on nasopharyngeal swab

Acute myocarditis (AM) is an acute-onset inflammatory heart disease with heterogeneous clinical presentation, varying from chest pain to cardiogenic shock.<sup>1</sup> Viral infections are believed to be associated with AM and indeed typical prodromic symptoms/signs (i.e. fever, flu-like symptoms, sore throat) are frequently reported in AM patients.<sup>1,2</sup> Respiratory viruses, such as influenza and corona viruses, identified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) from nasopharyngeal swabs, have been increasingly recognized as AM triggers.<sup>3,4</sup> Nevertheless, no systematic study ever investigated the presence of respiratory viruses in the upper respiratory airways in AM patients.

We conducted a single-centre, prospective study to ascertain the prevalence of respiratory viruses in nasopharyngeal swabs in consecutive adult patients ( $\geq 16$  years) with AM admitted to the Niguarda Hospital, Milan, Italy, between January 2018 and October 2020. We further evaluated differences in clinical presentation, management

and prognosis between those who tested positive vs. negative. The Institutional Review Board (Milano Area 3) approved the study, and patients signed an informed consent. A control group of 36 consecutive patients admitted for other acute cardiac disorders was used as comparator to assess the prevalence of positive viral genome in nasopharyngeal swabs in patients without AM (online supplementary Table S1).

Fifty consecutive patients with clinically suspected AM and symptom onset within 30 days were enrolled, including patients with all forms of clinical presentation from isolated chest pain to cardiogenic shock (i.e. fulminant myocarditis). All had high-sensitivity troponin T elevation upon admission (median 903 ng/L, normal value  $<14$  ng/L) and final AM diagnosis was confirmed either by endomyocardial biopsy (EMB) or cardiac magnetic resonance imaging (CMRI). Median age at presentation was 34 years, female prevalence was 24.0% (Table 1). A total of 49 (98.0%) patients underwent CMRI during hospitalization. Right ventricular EMB was performed in 28 patients (56.0%) after a median time of 2 days following admission, and histologic evidence of myocarditis based on Dallas criteria was found in 19/28 (67.9%), whereas the diagnosis of myocarditis based on the European Society of Cardiology (ESC) criteria<sup>5</sup> was confirmed in 26/28 cases (92.9%). Patients without histology or who did not reach Dallas/ESC criteria for AM had positive criteria on CMRI; one patient who did not perform CMRI had AM confirmed by histology.

All 50 patients underwent nasopharyngeal swabbing within a median time of 1 day after hospitalization and the specimens were tested by RT-PCR for the following respiratory viruses: coronavirus [subtypes 229E, NL63, OC43 and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from March 2020], influenza A and B, metapneumovirus, parainfluenza (subtypes 1 to 4), bocavirus (subtypes 1 to 4), rhinovirus A, B and C, syncytial respiratory virus (SRV) A and B, adenovirus and enterovirus. Nine (18.0%) patients tested positive for a virus on nasopharyngeal swab. The following viruses were identified: rhinovirus in four patients (in 1 case associated with influenza B), coronavirus in three patients (two subtype OC43, and one subtype 229E associated with SRV A positivity), parainfluenza virus subtype 2 in one case and adenovirus in the other case. None of the 36 (0%) patients admitted with acute cardiac disorders other than AM tested positive for a virus on nasopharyngeal swab as opposed to 9/50 (18.0%) in the AM

group ( $P = 0.009$ ). In 12/28 patients with AM (42.9%) undergoing EMB, myocardium RT-PCR-based viral genome search was performed, yielding positive results in 5 (41.7%) patients, with parvovirus (PV) B-19 identified in all cases (two cases with a viral load  $>500$  gEq/ $\mu$ g). Differences between patients who tested positive vs. negative on nasopharyngeal swab are reported in Table 1. Coherently with the presence of respiratory viruses in the nasopharyngeal mucosa, patients with positive nasopharyngeal swab had a higher prevalence of prodromal respiratory symptoms/signs compared with patients with negative nasopharyngeal swab (88.9% vs. 36.6%,  $P = 0.008$ ). Positive patients were more likely to be female (55.6% vs. 17.1% in negative patients,  $P = 0.03$ ) and to present with fulminant forms (55.6% vs. 17.1%,  $P = 0.03$ ), defined as requiring temporary mechanical circulatory supports (t-MCS) and/or inotropes. Accordingly, positive patients were more likely to receive a t-MCS compared with negative patients (44.4% vs. 9.7%;  $P = 0.02$ ). There were no significant differences when comparing other clinical characteristics including type of presentation, treatment, use of immunosuppressive therapy, and mortality. Lymphocytic AM was the most common histologic type in both groups. Of interest, all patients with a virus detected on nasopharyngeal swab had a lymphocytic AM, while detection of PVB-19 genome in the myocardium was not significantly different between the two groups.

In conclusion, in the present cohort of AM patients, the prevalence of viral identification on nasopharyngeal swab was 18.0%, with rhinoviruses and coronaviruses detected in the majority of patients. Nevertheless, delays in swabbing relative to symptom onset could have potentially underestimated the proportion of patients with a viral-induced AM. Nasopharyngeal swab may thus be a valuable tool to identify viral triggers in AM. To reinforce the proposed association between viral findings on nasopharyngeal swab and AM, none of the patients with acute cardiac disorders other than AM tested positive for a virus. Our findings suggest that virus-triggered immune-mediated reactions can play a major role in determining cardiac injury in a susceptible host with a permissive genetic background. Acquired knowledge on myocardial injury in SARS-CoV-2 infection supports this hypothesis. SARS-CoV-2 may induce an immune-mediated systemic inflammatory response sustaining the associated cardiac injury and possibly explaining the benefits from corticosteroid therapy.<sup>6</sup> Of

© 2021 European Society of Cardiology.

**Annexe 3. Nomenclature des acides aminés**  
D'après <sup>129</sup>.

<b>Acide aminé</b>	<b>Code 3 lettre</b>	<b>Code 1 lettre</b>
Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Autre ou inconnu	Xaa	X

## Rôle pronostique et physiopathologique de la dipeptidyl peptidase 3 circulante au cours de l'insuffisance circulatoire

**Introduction :** L'insuffisance circulatoire est une cause fréquente d'admission en réanimation, associée à une mortalité importante. Des travaux antérieurs ont démontré l'association entre une concentration de dipeptidyl peptidase 3 circulante (cDPP3) élevée et le pronostic à court terme des patients en insuffisance circulatoire. Nous avons fait l'hypothèse que cDPP3 jouait un rôle pathologique dans la genèse et/ou l'entretien de l'insuffisance circulatoire via son activité de clivage de peptides bioactifs, tels que les angiotensines et les enképhalines.

**Méthodes :** Deux approches ont été utilisées : 1. Sur le plan clinique, l'association entre cDPP3 et le pronostic a été analysée dans des populations de patients souffrant d'insuffisance circulatoire. 2. Sur le plan physiopathologique, les perturbations de l'hémodynamique systémique et rénale induites par cDPP3 ont été investiguées chez la souris. La relation entre les perturbations observées et la modulation du système rénine-angiotensine-aldostérone a été examinée.

**Résultats :** L'analyse des cohortes de patients a permis de confirmer l'association entre cDPP3 et le pronostic à court terme de l'insuffisance circulatoire. Dans la cohorte FROG-ICU, une association similaire entre concentration élevée de cDPP3 à l'inclusion et mortalité à J28 a été observée au cours du choc septique, cardiogénique, ou hémorragique. Dans la cohorte issue de l'essai ACCOST-HH, une concentration élevée de cDPP3 à l'inclusion était également associée à la mortalité à J30, à la durée du support cardiovasculaire ainsi qu'au recours à l'épuration extra-rénale ou à la ventilation mécanique invasive. Les patients chez qui la concentration de cDPP3 restait élevée à H72 avaient le plus mauvais pronostic. En comparaison, les patients ayant une concentration initialement haute mais décroissante de cDPP3 avaient une mortalité significativement réduite, comparable à celle des patients chez qui cDPP3 restait bas. Les patients dont la concentration de cDPP3 restait basse ou s'abaissait à H72 nécessitaient moins de supports d'organes. Chez la souris, l'administration de DPP3 purifié est associée à une augmentation significative du débit sanguin rénal alors que la pression artérielle n'est que peu affectée. L'administration de DPP3 était associée à une diminution significative des concentrations circulantes d'angiotensine II, III et IV en comparaison au contrôle. Une expérience de prétraitement par le valsartan a confirmé que l'effet rénovasculaire de DPP3 était secondaire à la diminution de la stimulation d'AT1R. L'administration de DPP3 était associée à une augmentation des concentrations circulantes de catécholamines endogènes. Une expérience de blocage adrénergique par le labétalol a démontré que ce relargage de catécholamines endogènes expliquait le maintien de la pression artérielle après administration de DPP3.

**Conclusion :** Ces résultats confirment la valeur pronostique de cDPP3 et confortent l'hypothèse d'un rôle pathologique de cDPP3 au cours de l'insuffisance circulatoire, via son activité de clivage des angiotensines. L'effet rénovasculaire suggère également l'implication de cDPP3 dans la genèse de la dysfonction rénale associée à l'insuffisance circulatoire. L'inhibition de cDPP3 pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique au cours de l'insuffisance circulatoire et devra faire l'objet d'investigations complémentaires.

**Mots clefs :** Dipeptidyl peptidase 3, insuffisance circulatoire, insuffisance rénale aiguë, débit sanguin rénal, catécholamines, système rénine-angiotensine-aldostérone