



Étude de la signalisation immunitaire et inflammatoire dans un modèle murin de cardiopathie septique et dans un modèle cellulaire de cardiotoxicité à l'immunothérapie anticancéreuse

Thi Thom Tran

► To cite this version:

Thi Thom Tran. Étude de la signalisation immunitaire et inflammatoire dans un modèle murin de cardiopathie septique et dans un modèle cellulaire de cardiotoxicité à l'immunothérapie anticancéreuse. Sciences du Vivant [q-bio]. Aix-Marseille Université, 2022. Français. NNT : 0000AIXM0000 . tel-04413196

HAL Id: tel-04413196

<https://hal.science/tel-04413196>

Submitted on 23 Jan 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.

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 07 Avril 2022 par

Thi Thom TRAN

Étude de la signalisation immunitaire et inflammatoire dans un modèle murin de cardiopathie septique et dans un modèle cellulaire de cardiotoxicité à l'immunothérapie anticancéreuse

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Génomique et Bioinformatique

École doctorale

Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire

TAGC INSERM U1090

- **Composition du jury**

- Pr. Jean-Luc FELLAHI Rapporteur
- Université Lyon 1
- Pr. Joachim ALEXANDRE Rapporteur
- Université de Caen Normandie
- Dr. Cécile DUPLAA Examinatrice
- Université de Bordeaux
- Dr. Catherine NGUYEN Présidente du jury
- Aix-Marseille Université
- Dr. Nathalie LALEVEE Directrice de thèse
- Aix-Marseille Université
- Pr. Franck THUNY Co-directeur de thèse
- Aix-Marseille Université
-
-

Affidavit

Je soussignée, Thi Thom TRAN, déclare que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Nathalie LALEVEE et Franck THUNY, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect, à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche, et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 25 janvier 2022



Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Alexandre Xerri, Frédéric Gallardo, Frank Kober, Calypso Mathieu, Natacha Fourny, **Thi Thom Tran**, et al., Female hormones prevent sepsis-induced cardiac dysfunction: an experimental randomized study. *Accepté pour publication dans Scientific Reports*.
2. **Thi Thom Tran**, Calypso Mathieu, Magali Torres, Béatrice Loriod, Linh Lê, et al., Effect of landiolol on sex-related transcriptomic changes in the myocardium during sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*, Springer, 2019, 7 (1).
3. C. Mathieu, Martine Desrois, Frank Kober, Nathalie Lalevée, **Thi Thom Tran**, et al., Sex-Mediated Response to the Beta-Blocker Landiolol in Sepsis. *Critical Care Medicine*, Lippincott, Williams & Wilkins, 2018, 46 (7), pp.e684-e691.

Participation à des congrès au cours de la période de thèse :

1. Printemps de la Cardiologie 2017, Montpellier. Poster présentation. Sex-mediated response to landiolol, a β 1-selectif adrenergic blocker, in myocardial dysfunction during sepsis.
2. MarMaRa Symposium, 2020, Marseille. Orale présentation. Development of an in vitro model of immunotherapy-induced cardiotoxicity.

Résumé

Les maladies cardiovasculaires restent une des principales causes de mortalité dans le monde malgré des progrès constants dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les mécanismes physiopathologiques associés à l'insuffisance cardiaque demeurent mal compris, particulièrement l'impact du système immunitaire (SI) et de l'inflammation dans l'apparition ou l'aggravation des dysfonctions myocardiques. Le rôle du SI et de l'inflammation est complexe, avec des régulations communes et/ou spécifiques selon la pathologie cardiaque concernée.

L'objectif de mes travaux de thèse était d'étudier les régulations des voies de signalisation liées au SI et à l'inflammation et d'évaluer leur impact dans deux cardiomyopathies, la cardiopathie septique et la cardiotoxicité immuno-induite.

La première partie de mes travaux a été réalisée dans un modèle de rat septique par ligature et ponction caecale (CLP). Au cours du sepsis, la dysfonction cardiaque est associée à une réponse immunitaire systémique et inappropriée contre l'infection, ainsi qu'à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique. Le blocage du récepteur β 1-adrénergique (β 1-AR) est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse dans le traitement de la dysfonction myocardique lors du sepsis. Mon objectif était d'étudier, au cours du sepsis, l'influence des hormones sexuelles femelles, sur la régulation par la voie β 1-adrénergique de la dysfonction cardiaque. Nos travaux ont montré que le landiolol, β 1-bloquant sélectif, améliore la dysfonction myocardique chez les mâles septiques en régulant négativement les voies de la réponse inflammatoire et de l'apoptose, en régulant positivement la voie β 1-adrénergique, et en augmentant l'expression des gènes de l'influx calcique. En revanche, le landiolol a induit des effets délétères chez les femelles en inhibant la voie β 1-adrénergique et en diminuant l'expression des gènes de l'efflux calcique. La protection de la dysfonction myocardique chez les femelles lors du sepsis est probablement liée aux hormones sexuelles femelles, qui interagissent avec les β -AR en régulant la voie adrénergique et l'inflammation, en particulier la voie JAK/STAT.

La seconde partie de mes travaux portait sur les cardiotoxicités induites par l'immunothérapie anti-cancéreuse. Il n'existait pas de modèle cellulaire performant permettant d'étudier les mécanismes liés à cette cardiotoxicité et mon travail de thèse a consisté à développer un modèle de cellules pluripotentes humaines induites (hiPSC) dérivées des cellules des patients porteurs de mélanome et traité par immunothérapie anti-PD-1/anti-CTLA-4. J'ai

comparé les résultats obtenus dans deux groupes différents de cellules, celles provenant de patients ayant présenté une myocardite (Myoc), et celles de patients n'ayant pas présenté de myocardite (nonMyoc) suite à l'immunothérapie. J'ai étudié la réponse à l'IFN- γ des hiPSC différenciées en cardiomyocytes (hiPSC-CM) et en cellules endothéliales (hiPSC-CE) afin de comprendre le rôle joué par chacune de ces cellules cardiaques lors de l'infiltration de tissu cardiaque par les cellules immunitaires. L'IFN- γ induisait une réponse mettant en jeu la voie JAK/STAT et l'inflammasome, en particulier celui de type NLRP3, plus prononcée dans les hiPSC-CE que dans les hiPSC-CM. Les cellules provenant des patients Myoc semblaient montrer plus de perturbations que celles des patients nonMyoc. Ces résultats, bien qu'encore très préliminaires, indiqueraient que notre modèle d'hiPSC a conservé des mécanismes observés par ailleurs dans le myocarde des patients. Ils montreraient également des processus spécifiques des cellules différenciées soit en cardiomyocytes, soit en cellules endothéliales lors de la réponse à l'IFN- γ .

En conclusion, le système immunitaire joue un rôle important mais complexe dans le développement et la régulation des dysfonctions cardiaques de nombreuses pathologies cardiovasculaires et nos travaux ont contribué à une meilleure connaissance du rôle du SI et de l'inflammation dans deux de ces pathologies. Identifier les voies de signalisation, mieux comprendre leur rôle, et rechercher des cibles à visée thérapeutique est un long chemin encore à parcourir mais qui s'avère être une voie stratégique majeure, à prendre en considération à l'avenir dans le traitement des cardiomyopathies.

Mots-clés : Système Immunitaire, Inflammation, Transcriptomique, Cardiopathie Septique, Cardiotoxicité des Immunothérapies, Interferon- γ

Abstract

Cardiovascular disease remains one of the leading causes of death worldwide despite continual progress in the development of new therapeutic strategies. The pathophysiological mechanisms associated with heart failure remain poorly understood, particularly the impact of the immune system (IS) and inflammation in the development or aggravation of myocardial dysfunction. The role of the IS and inflammation is complex, with common and/or specific regulations depending on the cardiac pathology involved.

The objective of my thesis work was to study the regulation of signaling pathways related to IS and inflammation and to evaluate their impact in two cardiomyopathies, the septic cardiopathy and the immuno-induced cardiotoxicity.

The first part of my work was carried out in a caecal ligation and puncture (CLP) rat model of sepsis. During sepsis, cardiac dysfunction is associated with a systemic and inappropriate immune response against infection, as well as with increased sympathetic nervous activity. Blockade of the β 1-adrenergic receptor (β 1-AR) is a new therapeutic approach that is promising in the treatment of myocardial dysfunction during sepsis. My objective was to investigate the influence of female sex hormones, on the regulation by the β 1-adrenergic pathway of cardiac dysfunction during sepsis. Our work showed that landiolol, a selective β 1-blocker, ameliorates myocardial dysfunction in septic males by negatively regulating the inflammatory response and apoptosis pathways, by positively regulating the β 1-adrenergic pathway, and by increasing calcium influx gene expression. In contrast, landiolol induced deleterious effects in females by inhibiting the β 1-adrenergic pathway and decreasing calcium efflux gene expression. The protection of myocardial dysfunction in females during sepsis is probably related to female sex hormones, which interact with β -ARs by regulating the adrenergic pathway and inflammation, particularly the JAK/STAT pathway.

The second part of my work focused on cardiotoxicities induced by anti-cancer immunotherapy. There was no efficient cellular model to study the mechanisms related to this cardiotoxicity and my thesis work consisted in developing a model of human induced pluripotent cells (hiPSC) derived from cells of patients with melanoma and treated by anti-PD-1/anti-CTLA-4 immunotherapy. I compared the results obtained in two different groups of cells, those from patients with myocarditis (Myoc), and those from patients without myocarditis (nonMyoc) following immunotherapy. I studied the IFN- γ response of hiPSC differentiated into cardiomyocytes (hiPSC-CM) and endothelial cells (hiPSC-CE) to understand the role played

by each of these cardiac cells during the infiltration of cardiac tissue by immune cells. IFN- γ induced a response involving the JAK/STAT pathway and the inflammasome, particularly the NLRP3 inflammasome, that was more pronounced in hiPSC-CE than in hiPSC-CM. Cells from Myoc patients appeared more impaired than those from non-Myoc patients. These results, although still very preliminary, would indicate that our hiPSC model conserved mechanisms otherwise observed in patient myocardium. They would also show specific processes of cells differentiated into either cardiomyocytes or endothelial cells during the response to IFN- γ .

In conclusion, the immune system plays an important but complex role in the development and regulation of cardiac dysfunction in many cardiovascular diseases, and our work has contributed to a better understanding of the role of IS and inflammation in two of these diseases. Identifying the signaling pathways, better understanding their role, and searching for new therapeutic targets still requires much investigation but is a major strategy to consider for the treatment of cardiomyopathies.

Keywords: Immune System, Inflammation, Transcriptomics, Septic Cardiopathy, Cardiotoxicity of Immunotherapies, Interferon- γ

Remerciements

Le projet de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien intellectuel et émotionnel des nombreuses personnes importantes dans ma vie.

Je tiens à remercier particulièrement le docteur **Nathalie Lalevée** et le professeur **Franck Thuny** qui m'ont donné l'opportunité d'effectuer ma thèse sous leur direction à la recherche cardiovasculaire.

J'aimerais exprimer ma plus profonde gratitude à **Nathalie Lalevée** qui m'a fait confiance depuis très longtemps ...Merci beaucoup pour ton suivi, ta grande patience, tes soutiens, tes conseils, tes encouragements, ton esprit de synthèse, ta gentillesse et ton humanité au cours de toutes ces années. Je tiens à la remercier infiniment pour avoir pris de son temps si précieux pour la correction de cette thèse.

Je remercie les professeurs **Jean-Luc Fellahi** et **Joachim Alexandre** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de me faire l'honneur de rapporter mon travail.

Je remercie également le docteur **Cécile Duplaa** de participer à mon jury et d'examiner mon travail.

Je remercie le docteur **Catherine Nguyen** pour avoir accepté d'être le président du jury. Particulièrement, je tiens à la remercier pour m'avoir présentée l'étude supérieure en France et m'avoir accueillie au sein du TAGC depuis mon parcours de Master 1.

Je remercie le professeur **Pascal Rihet** de m'avoir accueillie au sein du TAGC et son soutien pour finir ma thèse en bonne condition.

Je tiens à remercier le professeur **Marc Leone** et le docteur **Monique Bernard** qui m'ont donné la chance de participer à leur projet portant sur le sepsis.

Je remercie vivement **Jennifer Cautela** pour l'énorme travail qu'elle a porté au sujet de la cardiotoxicité. Sans elle, nous n'aurions pas pu récupérer de bons échantillons.

Je remercie **Samantha Conte** pour ton soutien si important pendant la dernière année de ma thèse ainsi que les corrections du manuscrit. Merci pour les moments partagés du repas de midi pour me rendre en bonne forme et bonne humeur.

Je remercie les personnes de la plateforme Macs : le docteur **Frédérique Magdinier**, **Claire El Yazidi**, **Natacha Broucqsault**, et **Pauline Heux** pour m'avoir accueillie chaleureusement

pendant ma formation de la culture des cellules souches. Merci pour les partages de votre expertise et votre connaissance et votre soutien par la suite.

Mes remerciements vont aussi à **Nicolas Fernandez**, et à **Béatrice Loriod** de la plateforme TGML pour votre aide précieuse dans les manipes transcriptomiques. Merci à **Laurence Borge** et à **Thi Tien Nguyen** de la plateforme culture cellulaire pour votre soutien, votre disponibilité. Je remercie également **Elsa Auroux-Castellani**, et **Brice Detailleur** de la plateforme Imagerie pour leur aide technique.

Je remercie **Magali Torres**, **Céline Baier**, **Iris Manosalva**, **Frédéric Gallardo** pour tout votre soutien technique, votre disponibilité, ...

Merci **Laurence Röder** qui m'a beaucoup supporté pendant mes parcours des Masters pour pouvoir obtenir cette thèse. Plus important, je la remercie de me rendre toujours en bonne humeur quand j'ai eu des difficultés !

Ça serait une grande erreur si oubli de remercier les docteurs **Xuan Nguyen Bui** et **Thi Uoc Nguyen** pour m'avoir menée des premiers pas dans la recherche. Leur passion pour la science et leur gentillesse sera ressentie infiniment dans ma mémoire.

Merci **Linh Chi Bui** pour tous ses précieux conseils pour ma vie professionnelle ainsi que pour ma vie personnelle.

Merci à mes belles amies **Thuy Quynh**, **Le Khanh** pour leur soutien et leurs encouragements. Surement que nous tous passeront ce parcours si long et difficile.

Je tiens à remercier mon mari **Tien Thang** et mes fils **Pheu**, **Min**, **Chun** pour leur sacrifice quotidien. Ils m'ont appris à ralentir et à profiter de la vie avec plein de perturbations mais rempli de joies. Leur amour m'a permis de surmonter les épreuves et les étapes difficiles. Je ne pourrais jamais demander une vie meilleure.

Je remercie du fond de mon cœur **mes parents**. J'espère qu'ils pourront être fier de mon travail même je sais bien que ce n'est pas le plus important besoin pour eux.

A tous ceux qui connaissent ce projet et m'ont dans vos vœux, MERCI !

Table de matières

AFFIDAVIT	1
LISTE DE PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES	2
RESUME	3
ABSTRACT	5
REMERCIEMENTS	7
TABLE DE MATIERES	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	16
AVANT-PROPOS	19
INTRODUCTION	20
1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES	20
2. LA CARDIOMYOPATHIE SEPTIQUE	22
2.1. Définitions	22
2.2. Mécanismes physiopathologiques	23
2.2.1. La défaillance cardiaque	23
2.2.2. La signalisation calcique intracellulaire	25
2.2.3. Le système β -adrénergique	27
2.3. Mécanismes moléculaires	32
2.3.1. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires	32
2.3.2. Les récepteurs Toll-like	33
2.3.3. Les récepteurs NOD-like et l'inflammasome	35
2.3.4. La signalisation inflammatoire	37
2.4. Dimorphisme sexuel	44
3. LA MYOCARDITE IMMUNO-INDUITE	47
3.1. Rôle physiologique des points de contrôle immunitaire	47
3.2. Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICIs) et traitements anticancéreux	49
3.3. La myocardite induite par l'immunothérapie aux ICIs	51
3.4. Apport des modèles expérimentaux	53
3.5. La voie de l'IFN- γ	56

4. UTILISATION DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES INDUITES EN RECHERCHE MEDICALE	59
4.1. Modélisation des maladies cardiaques héréditaires dans les hiPSC	61
4.2. Apport des hiPSC dans l'étude des cardiotoxicités induites par les traitements anticancéreux	62
4.3. Limites actuelles des hiPSC	63
ÉTUDES DE LA CARDIOMYOPATHIE SEPTIQUE	65
1. ÉTUDE 1	65
1.1. Contexte de l'étude 1	65
1.2. Article 1	65
1.3. Synthèse de l'article 1	82
2. ÉTUDE 2	82
2.1. Contexte de l'étude 2	82
2.2. Article 2	82
2.3. Synthèse de l'article 2	101
3. ÉTUDE 3	101
3.1. Contexte de l'étude 3	101
3.2. Article 3	102
3.3. Synthèse de l'article 3	136
4. DISCUSSION	136
4.1. Intérêt du modèle de rat CLP	136
4.2. Statut des hormones sexuelles femelles et dysfonction myocardique septique : modulation de la réponse immunitaire	137
4.3. Statut des hormones sexuelles femelles et régulation de la voie β -adrénergique au cours du sepsis	137
4.4. Statut des hormones sexuelles femelles sur l'effet des β -bloquants dans le sepsis	138
5. CONCLUSION	139
DEVELOPPEMENT D'UN MODELE <i>IN VITRO</i> POUR L'ETUDE DE LA MYOCARDITE IMMUNO-INDUITE	140
1. CONTEXTE	140
2. MATERIEL ET METHODES	141
2.1. Obtention et maintenance des hiPSC	141
2.2. Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes	141

2.3. Différenciation des hiPSC en cellules endothéliales	142
2.4. Ensemencement des cellules et traitement à l'IFN- γ	142
2.5. Immunomarquage pour les marqueurs des hiPSC-CM et hiPSC-CE	142
2.6. Cytométrie en flux pour les marqueurs des hiPSC-CM et hiPSC-CE	143
2.7. Extraction des ARNs totaux	144
2.8. Analyse transcriptomique	144
2.9. Analyse bioinformatique de l'étude transcriptomique	145
2.10. La PCR quantitative (q-PCR)	146
2.11. Cytométrie en flux pour les marqueurs membranaires liés à l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE	148
2.12. Analyse des caractéristiques contractiles des cardiomyocytes	149
2.13. La prolifération des cellules endothéliales	149
2.14. Analyse statistique	150
3. RESULTATS	150
3.1. Mise en place du modèle in vitro de cellules pluripotentes induites	150
3.1.1. hiPSC-CM (human induced Pluripotent Stem Cell-CardioMyocyte)	150
3.1.2. hiPSC-CE (human induced Pluripotent Stem Cell-Cellule Endothéliale)	150
3.2. Identification des gènes différentiellement exprimés et des voies de signalisation associées dans les cellules cardiaques dérivées d'hiPSC stimulées par l'IFN- γ	153
3.2.1. Gènes différentiellement exprimés dans les hiPSC-CM	155
3.2.2. Gènes différentiellement exprimés dans les hiPSC-CE	156
3.2.3. Identification des processus biologiques et voies de signalisation	157
3.2.4. Identification des processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-CE	160
3.2.5. Conclusion de l'étude transcriptomique	166
3.3. Étude de la réponse à l'IFN- γ des cellules cardiaques dérivées d'hiPSC provenant de patients porteurs de mélanome, ayant ou non déclaré une myocardite immuno-induite	167
3.3.1. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant les médiateurs de l'inflammation	169
3.3.2. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie JAK/STAT	169
3.3.3. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie NOD-like et Toll-like	170
3.3.4. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie de l'apoptose	170
3.3.5. Effet de l'IFN- γ sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM	173
3.3.6. Effet de l'IFN- γ sur la prolifération des hiPSC-CE	175
3.3.7. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des marqueurs membranaires impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire des hiPSC-CM et hiPSC-CE	175

3.3.8. Conclusion de l'étude réalisée sur les clones provenant de patients	177
4. DISCUSSION	177
4.1. Régulation de la réponse inflammatoire par l'IFN- γ	177
4.2. Effet direct de l'IFN- γ sur la dysfonction cellulaire	180
4.3. Effet de IFN- γ sur l'immunomodulation	180
5. LIMITES ET PERSPECTIVES	181
6. CONCLUSION	182
DISCUSSION GENERALE	183
1. PARTICIPATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE A LA DYSFONCTION CARDIAQUE	184
2. APPLICATION DANS LE CIBLAGE DE MARQUEURS PREDICTIFS ET L'IDENTIFICATION DES CIBLES THERAPEUTIQUES	186
CONCLUSION	188
PERSPECTIVES	188
BIBLIOGRAPHIE	190

Liste des figures

Figure 1 : Les cellules immunitaires présentes dans le cœur sain

Figure 2 : Activation du système immunitaire dans les cardiomyopathies

Figure 3 : Nouvelle définition du sepsis lors de la troisième définition consensuelle internationale

Figure 4 : Physiopathologie du choc septique et dysfonction myocardique secondaire

Figure 5 : Mécanismes de la dysfonction cardiaque au cours du sepsis

Figure 6 : Influence du sepsis sur le couplage excitation/contraction des cardiomyocytes

Figure 7 : Régulation de la signalisation calcique associée au développement de la cardiomyopathie septique

Figure 8 : Régulation des transitoires calciques par la voie β -adrénergique dans le cardiomyocyte

Figure 9 : Influence du sepsis sur la signalisation adrénergique

Figure 10 : Structure chimique du landiolol et de ses principaux métabolites (M1 et M2)

Figure 11 : La voie des récepteurs Toll-like (simplifiée)

Figure 12 : L'activation de l'inflammasome NLRP3

Figure 13 : La voie JAK/STAT

Figure 14 : Principales cascades de MAP kinases dans les cellules de mammifères

Figure 15 : Illustration schématique de l'effet du sexe sur les performances cardiovasculaires et la réponse immunitaire après une défaillance cardiaque

Figure 16 : Rôle physiologique des points de contrôle immunitaire et effet de leurs inhibiteurs dans la régulation de la réponse immunitaire aux traitements anticancéreux

Figure 17 : Les cardiotoxicités associées aux ICIs

Figure 18 : Rôle protecteur de l'IFN- γ et de PD-L1 dans le cœur et effet toxique des ICIs

Figure 19 : La voie de l'IFN- γ dépendante de STAT1

Figure 20 : Applications potentielles des hiPSC spécifiques de patient

Figure 21 : La voie $\beta 1$ -adrénergique dans les cœurs mâles et femelles après ligature et ponction caecale (CLP) et landiolol (Lnd)

Figure 22 : Voies de signalisation dans les cœurs mâles et femelles après ligature et ponction caecale (CLP) et landiolol (Lnd)

Figure 23 : Analyse des propriétés contractiles des hiPSC-CM

Figure 24 : Différenciation et caractérisation des hiPSC

Figure 25 : Caractérisation des hiPSC-CM

Figure 26 : Caractérisation des hiPSC-CE

Figure 27 : Plan expérimental ayant servi à générer les échantillons pour l'analyse transcriptomique

Figure 28 : Profils d'expression des gènes dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE stimulés par l'IFN- γ

Figure 29 : Processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et des hiPSC-CE associés à la stimulation par l'IFN- γ

Figure 30 : Processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-CE associés à la cardiotoxicité

Figure 31 : Plan expérimental ayant servi à générer les échantillons pour identifier les réponses liées à la stimulation à l'IFN- γ et à la cardiotoxicité *via* des analyses moléculaires et fonctionnelles

Figure 32 : Synthèse de l'expression des gènes codant les voies de signalisation dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, provenant de patients porteurs de mélanomes et ayant ou non présenté une cardiotoxicité, stimulés à l'IFN- γ

Figure 33 : Effet de l'IFN- γ sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM

Figure 34 : Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant les protéines contractiles et les canaux calciques dans les hiPSC-CM

Figure 35 : Effet de l'IFN- γ sur la prolifération des hiPSC-CE

Figure 36 : Effet de l'IFN- γ sur l'expression des marqueurs membranaires impliqués dans l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Figure 37 : Para-inflammation

Figure 38 : La réponse immunitaire liée à la dysfonction cardiaque

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modèles pré-cliniques de sepsis, traités par des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques

Tableau 2 : Fonction des principales cytokines

Tableau 3 : Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire actuellement approuvés par l'administration des aliments et des médicaments

Tableau 4 : Liste des primers

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour l'évaluation de l'expression des protéines membranaires liées à l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Tableau 6 : Nombre de sondes et gènes différentiellement exprimés après les analyses SAM multi-classes, dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE stimulés par l'IFN- γ

Tableau 7 : Annotations fonctionnelles pour les gènes différentiellement exprimés par la stimulation à l'IFN- γ dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE

Tableau 8 : Annotations fonctionnelles pour les gènes différentiellement exprimés dans le PCC comparé à la PS dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE

Tableau 9 : Caractéristiques des patients recrutés pour la génération de clones hiPSC

Tableau 10 : Variation du niveau d'expression des gènes dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, provenant de patients porteurs de mélanome et ayant ou non présenté une cardiotoxicité, stimulés par l'IFN- γ

Abréviations

AC	adénylate cyclase
AP-1	activator protein-1
APC	cellules présentatrices d'antigène
ATP	adénosine triphosphate
BMP4	bone morphogenetic protein
CACNA1	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
CASP	caspase
CD31/PECAM1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
cGMP	guanosine monophosphate cyclique
CI	index cardiaque
CLP	ligature et ponction caecale
CTLA-4	cytotoxique T-lymphocyte associated protein 4
cTnI	troponine I cardiaque
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9
DAMPs	danger associated molecular patterns
DOX	doxorubicine
EDN1	endothelin 1
EDVi	volume de fin de diastole indexé
eNOS	NOS endothéliale
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FAS	Fas cell surface death receptor
FC	fréquence cardiaque
FDR	false discovery rate
GBP	guanylate binding protein
GO	Gene Ontology
hiPSC	cellules souches pluripotentes humaines induites
hiPSC-CE	cellules endothéliales dérivées des hiPSC
hiPSC-CM	cardiomyocytes dérivés des hiPSC

HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B
HLA-DR	major histocompatibility complex, class II, DR
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
ICI	inhibiteur de point de contrôle immunitaire
IFN	interferon
IFNGR	récepteur d'IFN- γ
IL	interleukine
iNOS	NOS inducible
IP3R	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
IRF	interferon regulatory factor 3
JAK/STAT	Janus-kinase/signal transducers and activators of transcription
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
Lnd	landiolol
LPS	lipopolysaccharide
LTCC	les canaux calciques de type L
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDK	midkine
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MLC2a/2v	myosin light chain 2, de type ventriculaire ou auriculaire
MYD88	myeloid differentiation protein 88
MYH	myosin heavy chain
NCX	échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NK	natural killer
NLR	NOD-like receptor
NLRC	NLR-family CARD containing protein
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3
nNOS	NOS neuronale
NO	oxyde nitrique
NPR3	récepteur aux peptides natriurétiques
OVR	ovariectomisé

PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PI3K/AKT	phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B
PKA	protéine kinase A
PLB	phospholamban
PMCA/ATP2B	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1
PRR	pattern recognition receptors
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RYR	ryanodine
SAM	significance analysis of microarray
SERCA	pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique
SI	système immunitaire
SR	réticulum sarcoplasmique
SVi	volume systolique indexé
TCR	récepteur des cellules T
THBS1	thrombospondin 1
TLR	Toll-like receptor
TNF	facteur de nécrose tumorale
TNNT2	troponine T2 cardiaque
TRAM	Toll-like receptor adaptor molecule 2
TRIF	Toll-interleukin-1 receptor-domain containing adapter-inducing interferon- β
TUBA	tubulin alpha 8
VCAM1	molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1
VE-cadhérine	vascular endothelial cadherin
VEGF	facteur de croissance endothéliale vasculaire
VWF	facteur de von Willebrand
α -MyHC	α -myosin heavy chain
β -AR	β -adrénergique

Avant-Propos

J'ai démarré mon projet de thèse après mon Master 2 dont le projet portait sur l'étude de la cardiopathie septique dans un modèle de rat CLP.

Initialement, mon projet de thèse portait uniquement sur l'analyse des cardiotoxicités liées aux immunothérapies anticancéreuses. Cependant, les contrats de collaboration entre AP-HM, INSERM et Aix-Marseille Université n'étaient pas signés quand j'ai démarré ma thèse et nécessitaient plusieurs mois avant de l'être. De plus, la carditoxicité immuno-induite étant un évènement rare (moins de 2% des patients), le recrutement des patients et la génération des clones hiPSC ont demandé plusieurs mois avant que je puisse disposer des premiers clones.

D'autre part, les résultats obtenus durant mon master 2 sur la cardiopathie septique demandaient quelques mois supplémentaires d'analyse afin d'être publiés.

Nous avons donc fait le choix de terminer l'analyse des résultats sur la cardiopathie septique afin de rédiger un article où je suis en première position. Ces travaux sont complémentaires de 2 autres études dans lesquelles je suis co-auteure. Nous avons choisi de mettre en première partie de ce manuscrit l'ensemble de ces travaux.

Ce délai nous a permis d'obtenir les premiers clones hiPSC qui m'ont servi à mettre en place le modèle cellulaire d'étude des cardiotoxicités immuno-induites. Ces travaux sont présentés en deuxième partie de ce manuscrit.

Réunir l'étude de ces deux cardiopathies dans un même manuscrit prend tout son sens car toutes deux résultent d'une activation inappropriée du système immunitaire et de l'inflammation conduisant à des dysfonctions cardiaques qui peuvent être létales. Étudier les mécanismes physiopathologiques, dans ces deux cardiopathies, et les comparer permet de les approcher sous un angle unique.

Introduction

1. Le système immunitaire et les maladies cardiovasculaires

Malgré des progrès constants réalisés dans le développement de nouvelles thérapies, les maladies cardiovasculaires restent une des premières causes de mortalité dans le monde (Lozano et al., 2012). De nombreuses recherches ont été menées jusqu'à présent afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques liés à l'insuffisance cardiaque. Cependant, cette connaissance reste incomplète, particulièrement en ce qui concerne le rôle majeur et complexe du système immunitaire (SI) et de l'inflammation dans le développement ou l'aggravation de la défaillance cardiaque (Epelman et al., 2015).

Dans le cœur sain, il existe des populations faibles de cellules immunitaires (**Figure 1**). La quantité et la composition en cellules dépend de différents facteurs comme le stade de développement, l'espèce animale étudiée et l'état physiopathologique du cœur. Il existe dans le cœur des cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes, provenant à 75% de la lignée myéloïde (monocytes, neutrophiles, cellule dendritique, mastocytes et éosinophiles) et à 25% de la lignée lymphoïde (cellule T, cellule B, cellule natural killer (NK)) (Swirski and Nahrendorf, 2018). Cependant, les pathologies cardiovasculaires et le vieillissement modifient la composition des sous-populations immunitaires du cœur, afin de favoriser la croissance et la réparation des tissus. Étudié généralement dans le contexte d'une infection ou d'une blessure, il devient maintenant clair que le système immunitaire défend non seulement le myocarde contre les agents pathogènes, mais qu'il participe également au développement du cœur et au fonctionnement normal des tissus cardiaques (Swirski and Nahrendorf, 2018).

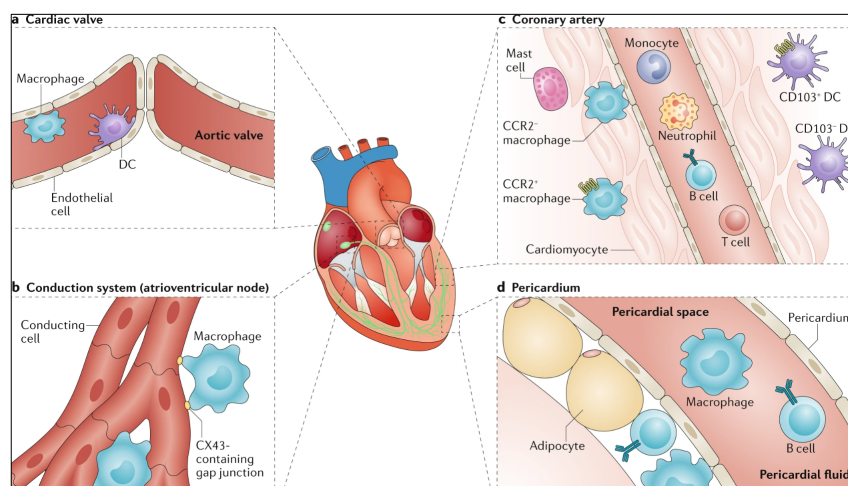


Figure 1 : Les cellules immunitaires présentes dans le cœur sain. (a,b) Les macrophages et les cellules dendritiques (DC) sont présents dans les valves cardiaques et dans le nœud auriculo-ventriculaire. (c) Différents types des cellules immunitaires circulantes comme les monocytes, les neutrophiles, les cellules T et B interagissent avec le tissu cardiaque. (d) Le fluide péricardique contient plusieurs types de leucocytes comme les macrophages et les cellules B. D'après Swirski and Nahrendorf, 2018.

Même si les causes qui induisent l'insuffisance cardiaque varient, la réponse immunitaire, innée et/ou adaptative peut être identique en partageant les processus communs de la réponse inflammatoire, y compris l'activation des récepteurs en reconnaissant les stimuli nuisibles, l'activation des voies de signalisation inflammatoire, la libération des médiateurs inflammatoires et le recrutement des cellules inflammatoires dans le tissu cardiaque inflammatoire (Chen et al., 2017). Par ailleurs, l'activation commune de la réponse immunitaire est modulée par le système nerveux autonome et les hormones sexuelles (Frantz et al., 2018). (Figure 2).

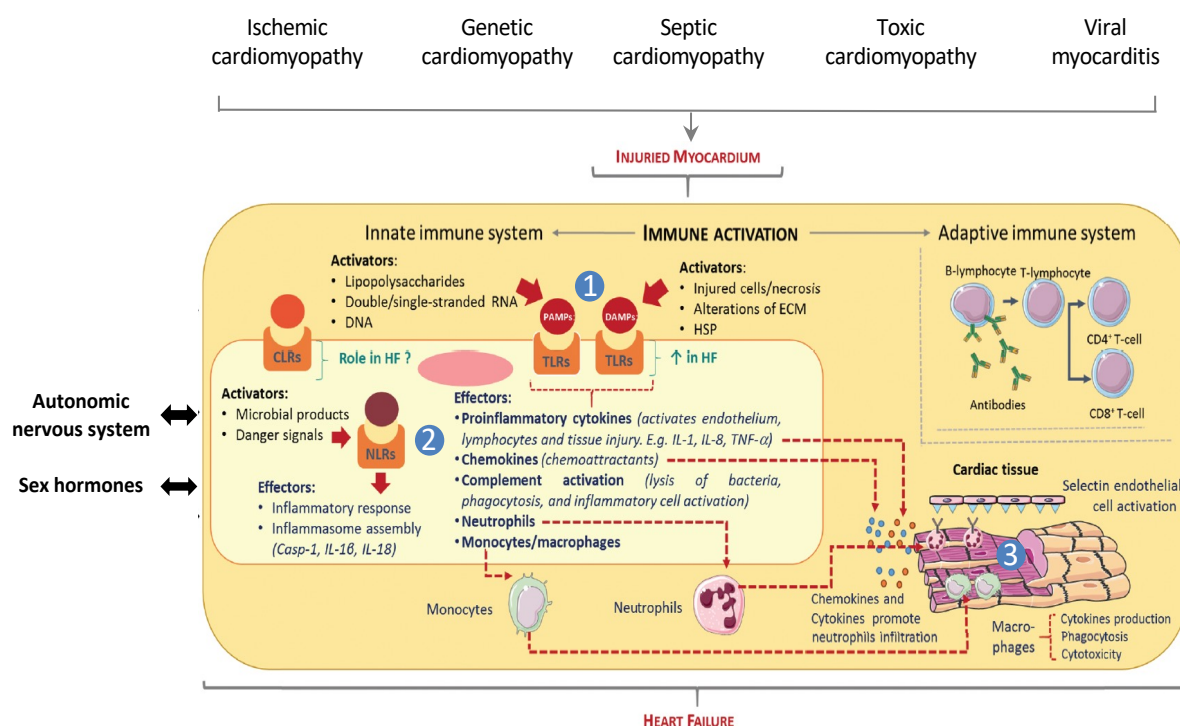


Figure 2 : Activation du système immunitaire dans les cardiomyopathies. Quel que soit le type de cardiomyopathie, l'activation de la réponse immunitaire innée passe par des processus communs caractérisés par (1) l'activation des récepteurs Toll-like (TLRs) ou NOD-like (NLRs) en reconnaissant les différents stimuli nuisibles, y compris les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) ou au danger (DAMPs) (2) la libération des médiateurs inflammatoires tel que les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines et (3) le recrutement des cellules immunitaires dans le tissu cardiaque inflammatoire. La réponse immunitaire adaptative est composée de processus hautement spécialisés qui sont nécessaires à l'activation des cellules T et B, et à la reconnaissance des antigènes spécifiques. Le système nerveux autonome et les hormones sexuelles peuvent moduler la réponse immunitaire. Adapté de Frantz et al., 2018.

2. La cardiomyopathie septique

2.1. Définitions

Le sepsis est une des principales causes d'admission en réanimation. La mortalité varie de 10% pour le sepsis à 40% en cas de choc septique (Singer et al., 2016). La définition du sepsis a été révisée au cours de plusieurs consensus afin d'homogénéiser les pratiques médicales et d'améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.

La définition la plus connue a été proposée par l'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Critical Care Society en 1991. Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique ont été considérés comme un processus d'aggravation continue. Le SIRS se définissait par la présence d'au moins deux critères sur les quatre que sont la température, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, et le nombre de globules blancs. Le SIRS évoluait en sepsis lorsqu'une infection s'ajoutait à l'inflammation, qu'elle soit bactérienne, virale ou fongique. Le sepsis sévère correspondait à un sepsis où existait une défaillance d'un ou de plusieurs organes. Enfin, le choc septique était un sepsis sévère avec une hypotension non corrigée par le remplissage. Cependant, cette définition comportait des limites importantes. Certains patients ne présentaient pas deux critères du SIRS mais développaient une défaillance organique due à une infection. Depuis 2016, lors des Troisièmes définitions consensuelles internationales pour le sepsis et le choc septique, de nouvelles définitions ont été introduites (**Figure 3A**). Le sepsis est désormais défini comme une dysfonction d'organe, secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte à une infection (Singer et al., 2016). Il est aussi proposé une définition opérationnelle pour la défaillance organique, en utilisant le score Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) en évaluant les fonctions des systèmes respiratoire, cardiovasculaire, coagulant, rénal, hépatique et nerveux central chez les patients (Singer et al., 2016). La présence d'une infection et un score SOFA d'au moins 2 points ont été définis comme un sepsis. Afin de faciliter l'identification du sepsis, le quick SOFA (qSOFA), un score SOFA simplifié, a été mis en place (**Figure 3B**). La présence de 2 critères quick SOFA identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic vital et justifiant d'un monitoring accru (Delano and Ward, 2016). Le choc septique est une forme particulière du sepsis nécessitant des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) égale ou supérieure à 65 mm Hg et ayant un niveau de lactates supérieur à 2 mmol/l malgré un remplissage adéquat (Singer et al., 2016). Parmi ces nouvelles définitions, le sepsis sévère n'est plus utilisé.

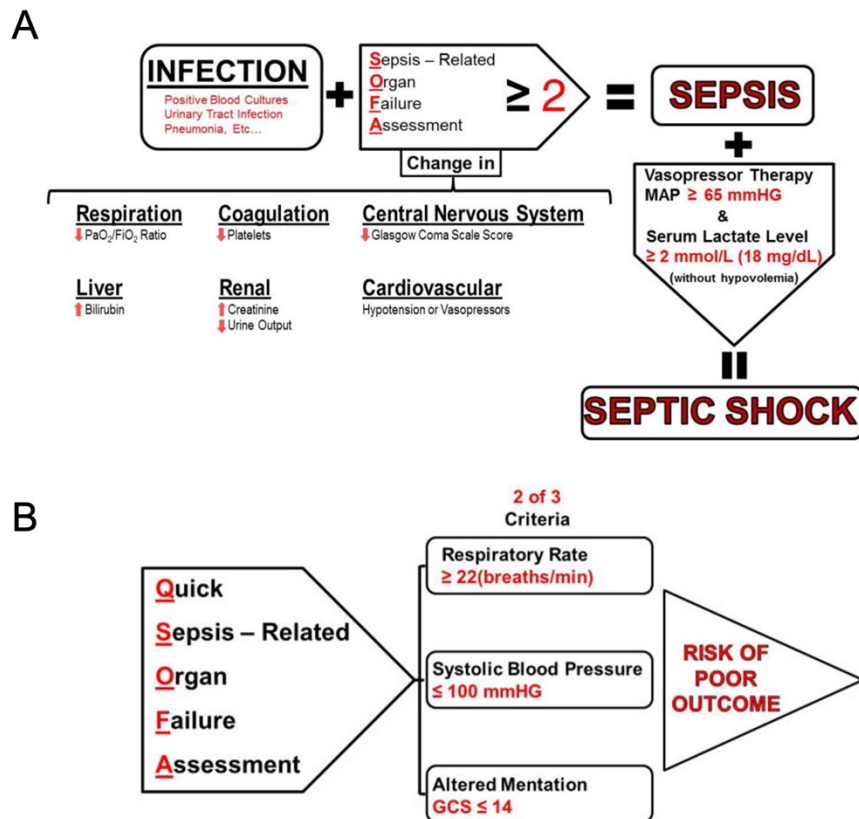


Figure 3 : Nouvelle définition du sepsis lors de la troisième définition consensuelle internationale. (A) Le sepsis est désormais défini par la présence un score d'évaluation séquentielle des défaillances organiques (SOFA) d'au moins 2 points lié à une infection. Le choc septique est une forme particulière du sepsis qui se caractérise avec des anomalies importantes circulatoires et métaboliques. Il est défini par l'association du sepsis avec l'utilisation de médicaments vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure ou égale à 65 mmHg et un niveau de lactates > 2 mmol/l (18 mg/dl) malgré un remplissage adéquat. (B) Calcul du quick SOFA (qSOFA). La présence de 2 critères qSOFA identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic vital. Adapté de Delano and Ward, 2016.

2.2. Mécanismes physiopathologiques

2.2.1. La défaillance cardiaque

Une des manifestations de la défaillance d'organes liée au sepsis est la dysfonction cardiaque, présente chez environ 60% des patients en choc septique (Vieillard-Baron et al., 2008). Elle présente plusieurs caractéristiques principales : (1) une dilatation ventriculaire gauche avec une pression de remplissage normale ou faible, (2) une contractilité ventriculaire réduite, et (3) un dysfonctionnement ventriculaire droit ou un dysfonctionnement ventriculaire gauche, caractérisé par une diminution du volume systolique indexé (SVi) et du volume télédiastolique indexé (EDVi) (**Figure 4**) (Martin et al., 2019).

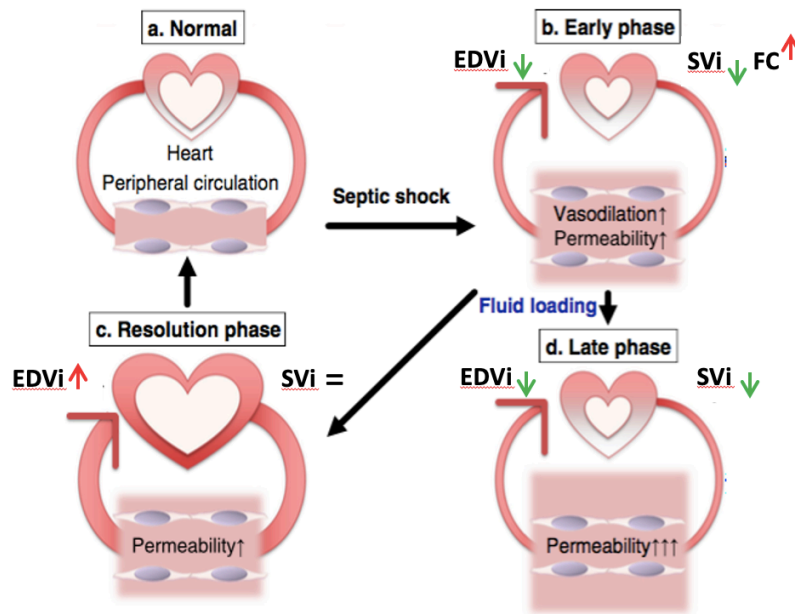


Figure 4 : Physiopathologie du choc septique et dysfonction myocardique secondaire. (a) Le cœur et la circulation sanguine en situation normale. (b) Au début du choc septique, la perméabilité vasculaire est élevée, les vaisseaux sont dilatés, et une fréquence cardiaque (FC) élevée n'est pas suffisante pour maintenir une fonction cardiovasculaire normale : les volumes systolique indexé (SVi) et le volume de fin de diastole indexé (EDVi) diminuent. (c) Après un remplissage suffisant, on récupère une partie des fonctions cardiaques et le patient va mieux après quelques jours. (d) Chez certains patients, le remplissage n'est pas suffisant car la perméabilité reste très élevée. Les fonctions cardiovasculaires restent défaillantes et finissent par conduire au choc septique et à la mort du patient. Adapté de Kakihana et al., 2016.

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, les mécanismes de la cardiomyopathie induite par le sepsis ne sont toujours pas entièrement élucidés. Au cours des dernières décennies, un certain nombre d'études expérimentales et cliniques ont clarifié certains mécanismes du dysfonctionnement cardiaque observé chez les patients atteints de sepsis (Figure 5).

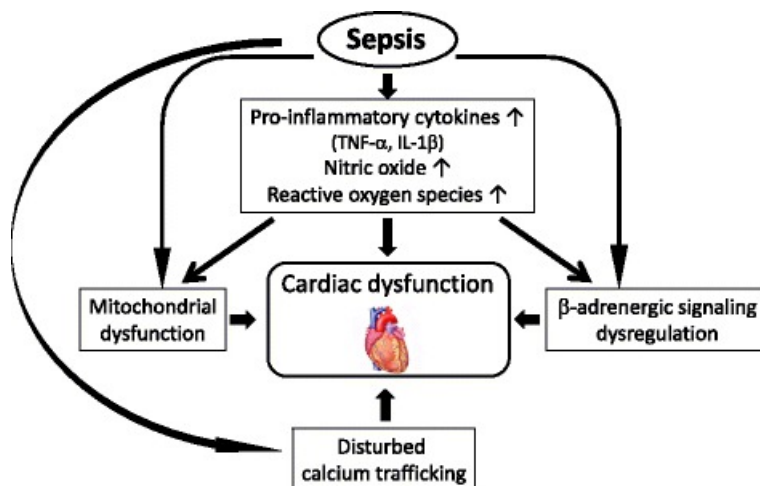


Figure 5 : Mécanismes de la dysfonction cardiaque au cours du sepsis. Au cours du sepsis, une augmentation de facteurs comme les cytokines : le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α et l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'oxyde nitrique (NO), induit une dysfonction mitochondriale, une modification du fonctionnement des canaux transportant le calcium et une dérégulation de la voie β -adrénergique qui perturbent le fonctionnement cardiaque. D'après Suzuki et al., 2017.

2.2.2. La signalisation calcique intracellulaire

En conditions physiologiques, la dépolarisation membranaire permet l'ouverture des canaux calciques de type L du sarcolemme, induisant un influx de calcium dans le cytosol. Cet influx calcique active la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (SR) vers le cytosol *via* les récepteurs à la ryanodine (RZR). La fixation du calcium cytosolique sur les protéines contractiles permet la contraction du cardiomyocyte. La dérégulation des transitoires calciques au cours du choc septique joue un rôle prédominant dans la cardiomyopathie septique (**Figure 6**). Lew et al., 1996 ont montré que l'expression des canaux calciques de type L était diminuée chez le lapin au cours du choc endotoxinique, et que cette diminution était associée à une altération de la fonction ventriculaire gauche. Chez le rat septique, induit par ligature et ponction caecale (CLP), l'expression des canaux calciques de type L augmente après 9h et diminue après 18h de CLP (Hsu et al., 2007). *In vitro*, le courant calcique de type L diminue dans les cardiomyocytes isolés du ventricule droit de porcs en choc septique (Stengl et al., 2010) et dans les cardiomyocytes de rats sains stimulés par lipopolysaccharide (LPS) ou par la cytokine inflammatoire interleukine (IL)-1 β (Abi-Gerges et al., 1999 ; Liu and Schreur, 1995). Cette baisse d'expression entraîne une diminution de la concentration de calcium intracellulaire systolique et donc la diminution des contractions des cardiomyocytes. De plus, la densité des RZR à la membrane du SR est diminuée chez le rat en choc septique, ce qui se traduit par une diminution de la libération de calcium du SR (Dong et al., 2001). Par ailleurs, durant la relaxation, la recapture du calcium par la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) dans le SR est liée au phospholamban (PLB). Le PLB peut être phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) activée par des agonistes β -adrénergiques (Eschenhagen, 2010). Les mécanismes de régulation de la voie calcique ne sont toujours pas complètement élucidés. Rudiger et al., 2013 ont analysé les dérégulations transcriptomiques de la voie β -adrénergique et du flux calcique dans le myocarde de rat septique ; ils ont observé une augmentation de RZR2, et une diminution des transcrits de SERCA et de PKA. De plus, le traitement des cardiomyocytes avec de faibles concentrations d'IL-1 β et du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , afin de mimer l'arythmie observée durant le sepsis *in vivo*, induit un défaut de relaxation diastolique suggérant que l'inflammation pourrait également moduler la voie calcique (Duncan et al., 2010). La diminution de la sensibilité au calcium des myofilaments est

aussi un élément essentiel de la dysfonction contractile septique. Les cardiomyocytes isolés de souris septiques (par injection de LPS) présentent une augmentation de la phosphorylation de la troponine I sur les sérines 23/24, modulée par la PKA ou la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui sont des acteurs de la voie β -adrénergique.

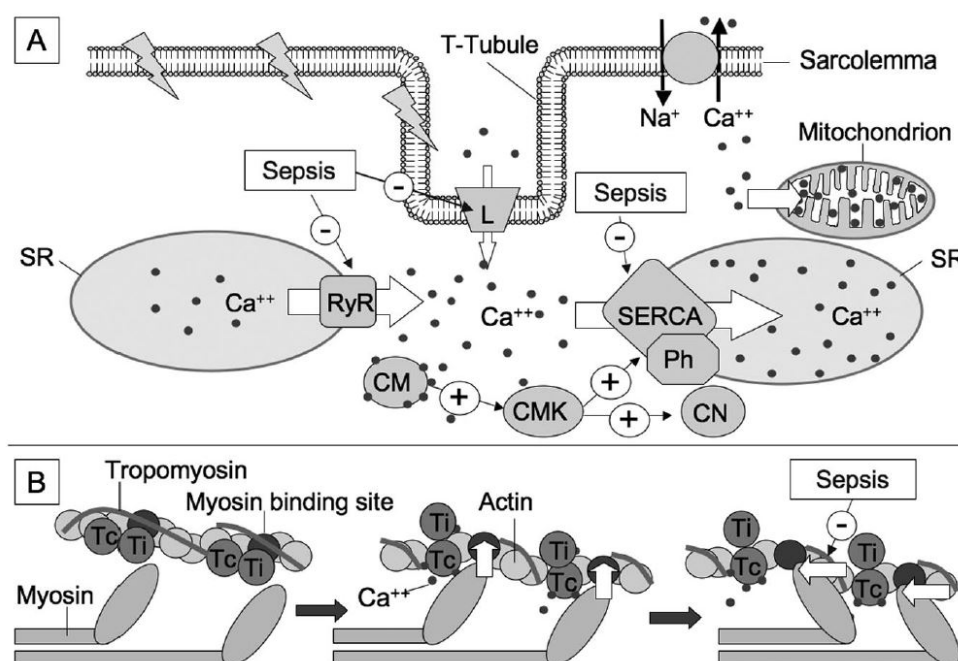


Figure 6 : Influence du sepsis sur le couplage excitation/contraction des cardiomyocytes. (A-B) Dans les conditions non stimulées, la dépolarisation pendant le potentiel d'action ouvre les canaux calciques de type L dans les tubules T, permet au Ca^{2+} d'entrer dans la cellule. Ce calcium active le récepteur à la ryanodine (RyR) sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (SR) qui libère le calcium du SR vers le cytosol. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} initie des changements de conformation des myofilaments permettant la contraction du cardiomyocyte. L'élimination du Ca^{2+} via la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) inverse le processus. Une partie du Ca^{2+} se lie à la calmoduline (CM), une protéine régulatrice qui abaisse le Ca^{2+} cytosolique via la calmoduline-kinase (CMK), qui stimule la recapture du Ca^{2+} dans le SR. **(A)** Le sepsis inhibe le couplage excitation/contraction à divers endroits. **(B)** Le sepsis diminue la sensibilité au calcium et provoque des dommages à l'appareil contractil. D'après Rudiger and Singer, 2007.

Il a été montré que plusieurs voies de signalisation sont associées à la régulation de la voie calcique lors du développement de la cardiomyopathie septique (**Figure 7**) (Hobai et al., 2015). L'effort d'élucider ces mécanismes cellulaires représente une voie stratégique majeure à suivre afin de développer de nouvelles thérapies contre cette cardiomyopathie.

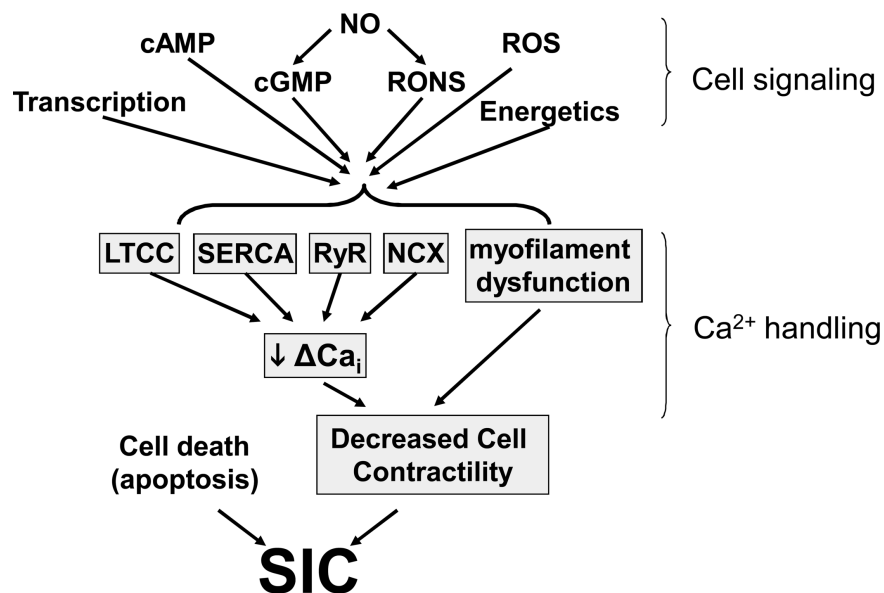


Figure 7 : Régulation de la signalisation calcique associée au développement de la cardiomyopathie septique. La diminution de la force contractile cardiaque dans la cardiomyopathie septique est due à deux facteurs : la mort cellulaire et la diminution de la fonction contractile des cardiomyocytes survivants. En amont de la régulation intracellulaire du calcium, un certain nombre de voies de signalisation sont impliquées, notamment celle de l'oxyde nitrique (NO), des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS), de l'activation de la phosphorylation dépendante du cAMP et du cGMP, des modifications transcriptionnelles et métaboliques,... toutes ces voies peuvent induire la dérégulation des transitoires calciques en régulant les récepteurs à la ryanodine (RYR), la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), les canaux calciques de type L (LTCC), l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX) et des dysfonctions des myofilaments cardiaques. D'après Hobai et al., 2015.

2.2.3. Le système β-adrénergique

Le système β-adrénergique présent dans de nombreux organes (cœur, utérus, foie, système nerveux) joue un rôle important dans le choc septique. Il existe trois sous types de récepteurs β-adrénergiques : les récepteurs β1 (β1-AR), principalement localisés dans le cœur ; les récepteurs β2 (β2-AR), exprimés dans le cœur et dans les muscles lisses des bronches et des vaisseaux sanguins ; les récepteurs β3 (β3-AR) sont les moins abondants dans le cœur. Les β1-AR et β2-AR sont également présents sur de nombreuses cellules du système immunitaire (de Montmollin et al., 2009). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G. Les agonistes de β1-AR sont des catécholamines libérées par le système nerveux sympathique comme l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine. Dans le cœur, la stimulation des β1-AR par des agonistes entraîne la formation d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) *via* l'adénylate cyclase (AC). L'AMPc active la protéine PKA qui phosphoryle plusieurs cibles intracellulaires et des canaux transmembranaires conduisant à la

libération de calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, permettant ainsi la contraction des cellules cardiaques (Eschenhagen, 2010) (**Figure 8**).

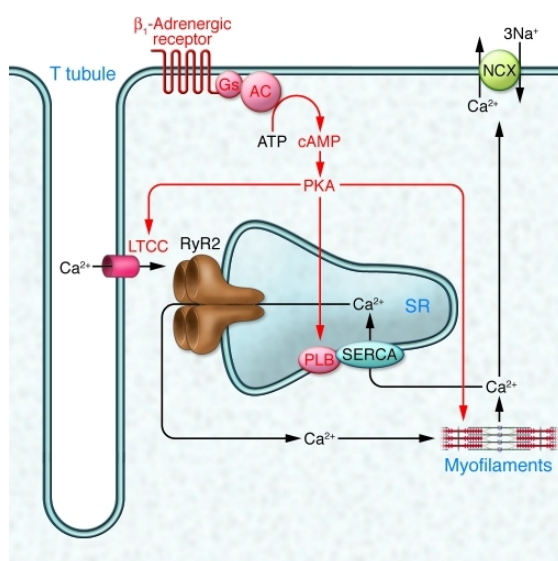


Figure 8 : Régulation des transitoires calciques par la voie β-adrénergique dans le cardiomyocyte.

Dans les conditions non stimulées (flèches noires), la dépolarisation pendant un potentiel d'action ouvre les canaux calciques de type L (LTCC) dans les tubules T, permettant au calcium d'entrer dans la cellule. Ce calcium active le récepteur à la ryanodine 2 (RyR2) sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (SR) qui libère le calcium du SR vers le cytosol. L'augmentation de la concentration de calcium initie des changements de conformation des myofilaments permettant la contraction du cardiomyocyte. L'élimination du calcium *via* la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) inverse le processus. Les catécholamines stimulent le couplage excitation/contraction (flèches rouges) en phosphorylant les LTCC (augmentation de l'afflux de calcium), le phospholamban (PLB) (augmentation de la recapture de calcium dans le SR), l'inhibiteur de la troponine et la protéine C liant la myosine (augmentation de la relaxation). D'après Eschenhagen, 2010.

a) Activation de la voie β-adrénergique

La stimulation adrénergique par les catécholamines, et sur un temps court, augmente la contractilité et la fréquence du cœur. Par contre, une stimulation adrénergique prolongée et excessive, comme lors du sepsis avec l'augmentation de la production endogène de catécholamines, est néfaste pour la contractilité cardiaque (**Figure 9**). Par ailleurs, chez des patients en réanimation, l'administration de dobutamine (agoniste des récepteurs β_1), dans le but de maintenir un débit cardiaque élevé, s'est soldée par une augmentation de la mortalité dans le groupe traité (Silverman et al., 1993). Chez le rat, l'administration d'isoprotérénol pendant 7 jours entraînait une défaillance cardiaque hypertrophique (Desrois et al., 2014). Il a également été montré que la densité de récepteurs β-adrénergiques diminue par séquestration et diminution de leur expression dans le cœur des rats septiques (Shepherd et al., 1987). Cette baisse est associée à une diminution d'expression des protéines $\text{G}\alpha$ (Matsuda et al., 2000), à

une augmentation des protéines Gi et à une diminution de l'AC chez le rat mâle septique 18h après la CLP (Wu et al., 2003) et chez les patients en choc septique (Böhm et al., 1995). Dans un modèle *in vitro* de cardiomyocytes de souris, stimulés par LPS, l'activation β 1-AR par la dobutamine favorise la survenue de l'apoptose par l'activation des Caspases -3, 8, et 9 et augmente la concentration du calcium intracellulaire (Wang et al., 2015).

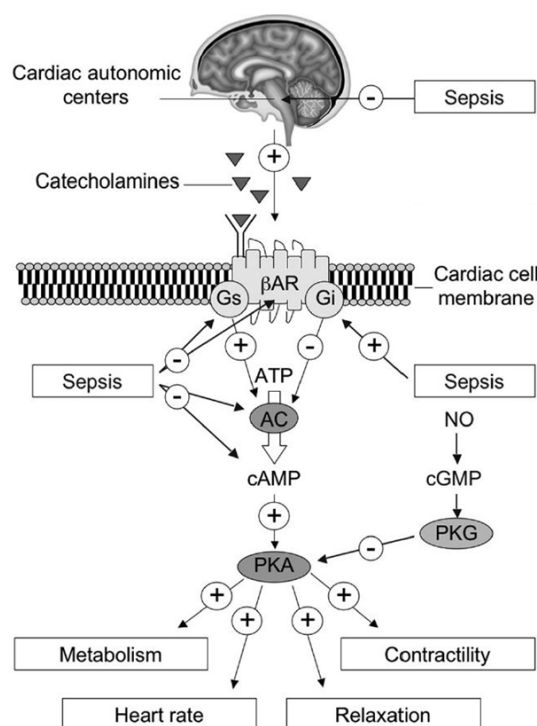


Figure 9 : Influence du sepsis sur la signalisation adrénergique. Le sepsis induit une perturbation à différents niveaux de la signalisation et en partie *via* le NO, la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) et la protéine kinase G (PKG). D'après Rudiger and Singer, 2007.

Le système adrénergique joue un rôle important dans la production et la maturation médullaire des monocytes *via* les β 2-AR. La stimulation des β 2-AR sur les cellules immunitaires est responsable d'une réponse anti-inflammatoire. L'adrénaline, par une activation de β 2-AR, inhibe l'activation macrophagique, la prolifération lymphocytaire T et diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6, IL-1 β (Muthu et al., 2005). Par contre, dans une lignée de macrophages *in vitro*, l'activation des β 2-AR par un agoniste spécifique, le salmétérol, est associée à une augmentation de la transcription et de la traduction d'IL-1 β et d'IL-6. Cette augmentation est indépendante de la PKA et du facteur de transcription le nuclear factor- κ B (NF- κ B) mais dépend plutôt de la voie mitogen-activated protein (MAP) kinase (Tan et al., 2007).

b) Inhibition de la voie β -adrénergique

Lors d'un sepsis avéré avec défaillance d'organe, la stimulation adrénergique du cœur a été diminuée par l'utilisation de β -bloquants (esmolol, propranolol, metoprolol et landiolol) dans

plusieurs études précliniques et cliniques (Suzuki et al., 2017). Les données cliniques sur l'utilisation des β -bloquants dans le sepsis et le choc septique sont peu nombreuses, avec des populations faibles et inhomogènes. Morelli et al., 2013 ont publié la première étude prospective, monocentrique, randomisée contre placebo, chez les patients en choc septique en réanimation. Le traitement par esmolol a été utilisé afin de réduire la fréquence cardiaque chez les patients dont la fréquence cardiaque était supérieure ou égale à 95 battements par minute (bpm) lors d'un choc septique. Les patients étaient randomisés en 2 groupes : un groupe recevant une perfusion continue d'esmolol après 24h de stabilisation hémodynamique afin d'obtenir une fréquence cardiaque comprise entre 80 et 94 bpm pendant toute la durée de leur séjour en réanimation, et un groupe contrôle. Le volume d'éjection systolique augmentait chez les patients qui recevaient l'esmolol et une réduction de la fréquence cardiaque a été observée. L'étude a également montré une diminution de la mortalité à 28 jours, associée à la réduction de la fréquence cardiaque dans le groupe traité par esmolol (49.4% contre 80.5% dans le groupe contrôle, $p < 0.001$).

Le landiolol, β_1 -bloquant présente l'intérêt d'être très sélectif des récepteurs β_1 -adrénergiques (**Figure 10**). Son rapport β_1/β_2 est de 255 contre 33 pour l'esmolol (Plosker, 2013). Le landiolol est utilisé dans la prévention et le traitement des tachyarythmies telles que la fibrillation auriculaire, le flutter auriculaire et la tachycardie sinusale chez les patients ayant une fonction ventriculaire gauche normale ou réduite. Il diminue significativement la fréquence cardiaque sans réduire la pression artérielle et stabilise l'hémodynamique chez les patients post-chirurgicaux (Okajima et al., 2015). Son délai d'action rapide et sa demi-vie courte (4 minutes) permettent son arrêt rapide en cas de mauvaise tolérance. Le landiolol est hydrolysé en une forme inactive par les estérases. A noter que les estérases sont plus activées chez les rats femelles que chez les rats mâles (Illsley and Lamartiniere, 1981).

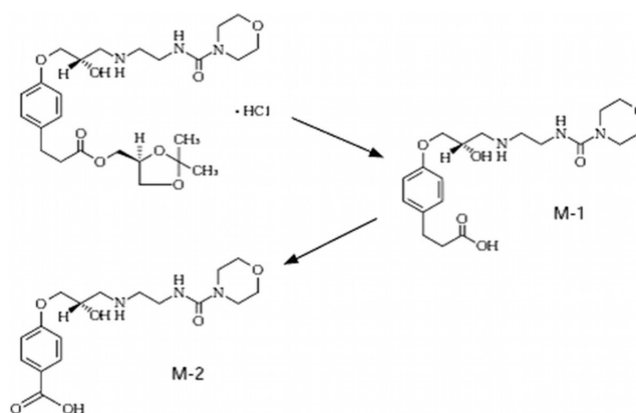


Figure 10 : Structure chimique du landiolol et de ses principaux métabolites (M1 et M2). La forme active de la molécule est associée à l'hydrochloride. Elle est rapidement métabolisée en ses deux principaux métabolites inactifs M1 et M2 (demi-vie de 4 minutes).

Dans les modèles expérimentaux, plusieurs études ont montré que le blocage β -adrénergique était bénéfique pour la fonction cardiaque au cours du sepsis ou du choc septique. Elles sont résumées dans le **Tableau 1**.

Modèle et traitement	Résultats principaux au niveau moléculaire	Résultat principaux liés à la dysfonction cardiaque	Référence
Rat mâle, CLP, Esmolol 10mg ou 20mg/kg/h pendant 24h	- TNF- α $\downarrow$, IL-1 β = - Densité de β 1-AR $\uparrow$	- FC, pression artérielle : $\downarrow$ - Débit cardiaque et fonction ventriculaire gauche : $\uparrow$	(Suzuki et al., 2005)
Rat mâle, LPS, Landiolol 0,1mg/kg pendant 24h	- TNF- α et IL-6, HMGB1, NF- κ B1 : $\downarrow$	- FC, pression artérielle : $\downarrow$ - Fonction ventriculaire gauche $\uparrow$	(Hagiwara et al., 2009)
Rat mâle, LPS/ CLP, Métopronol (plusieurs doses)	- IL-6, IL-18, MCP-1 : $\downarrow$	- Débit cardiaque = - FC $\downarrow$ - EDVi $\uparrow$ - Survie $\uparrow$	(Ackland et al., 2010)
Cochon, LPS, Esmolol		- FC $\downarrow$ - EDVi $\uparrow$	(Aboab et al., 2011)
Souris, LPS Esmolol, 10mg/kg/h	- mARN de cAMP $\downarrow$	- Survie $\uparrow$	(Ibrahim-Zada et al., 2014)
Rat mâle, Esmolol après 4h CLP et pendant 14h	- IL-1 α , IL-2, et IL-6 NF- κ B : $\downarrow$ - iNos $\downarrow$, p-eNOS/eNOS $\uparrow$ - p-AKT/AKT $\uparrow$	- FC $\downarrow$ - Débit cardiaque = - EDVi $\uparrow$ - Survie $\uparrow$	(Kimmoun et al., 2015)

	- mARN de α -AR $\nearrow$ - p38MAPK, pJnk/Jnk, Caspase-8 et Caspase-3 : = - P53 : $\searrow$		
Rat mâle, Esmolol après 4h CLP et pendant 14h, plusieurs doses	- IL-6, NF- κ B $\searrow$ - iNos $\searrow$, p-eNOS/eNOS $\nearrow$ - p-AKT/AKT $\nearrow$	- FC $\searrow$ - Débit cardiaque = - EDVi $\nearrow$	(Wei et al., 2016)
Souris, LPS, Esmolol pendant 6h	- Caspase-3, Bax : $\searrow$ - P-JNK/JNK, P-p38/p38 : $\searrow$ - BCL2 $\nearrow$	- FC $\searrow$ - Fonction ventriculaire gauche : $\nearrow$	(Wang et al., 2016)

Tableau 1 : Modèles pré-cliniques de sepsis, traités par des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques. FC : fréquence cardiaque, EDVi : volume de fin de diastole indexé.

Pour résumer, le blocage de la voie β -adrénergique par les β -bloquants dans divers modèles de sepsis et de choc septique montrent des effets contradictoires. Cependant, des effets bénéfiques sont observés comme la diminution de la fréquence cardiaque, l'amélioration des performances cardiaques, la diminution la réponse inflammatoire et l'amélioration de la survie.

2.3. Mécanismes moléculaires

Suite à l'infection, la réponse inflammatoire systémique induite joue un rôle central, direct ou indirect, en régulant des processus cellulaires différents *via* plusieurs voies de signalisation qui sont responsables de la cardiomyopathie septique.

2.3.1. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

Des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes, portant le nom de pathogen associated molecular patterns (PAMPs), peuvent déclencher la réponse inflammatoire (système immunitaire inné) par activation des récepteurs appelés pattern recognition receptors (PRRs). Les PAMPs sont des composants bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. Il peut s'agir du LPS pour les bactéries à Gram négatif, l'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positif,

le zymosan, les flagellines, l'ADN bactérien,... (Lin and Knowlton, 2014). Les PRRs reconnaissent également divers signaux endogènes activés lors de lésions tissulaires ou cellulaires qui sont connus sous le nom de danger associated molecular patterns (DAMPs). Les DAMPs classiques comprennent les protéines de choc thermique (HSP) comme HSP60, HSP72, HSC70,... On retrouve ainsi : l'héparane sulfate, l'acide hyaluronique, le fibrinogène, le surfactant A et surtout le high mobility group box 1 (HMGB1) (Lin and Knowlton, 2014).

Les PRRs s'expriment à la fois dans les cellules immunitaires et non immunitaires comme les adipocytes, les cellules épithéliales intestinales, les cellules endothéliales vasculaires et les cardiomyocytes. Les familles de PRRs comprennent les Toll-like receptors (TLRs), les NOD-like receptors (NLRs), les retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) et les C-type lectin receptors (CLRs) (Frantz et al., 2018).

2.3.2. Les récepteurs Toll-like

Plus spécifiquement, les récepteurs Toll-like (TLRs) sont des récepteurs extrêmement conservés entre les espèces animales. Ces récepteurs initient la réponse immunitaire innée et régulent la réponse adaptative. Les TLRs reconnaissent une large gamme de motifs comme l'ARN double brin (TLR3), le LPS (TLR4), l'ARN simple brin (TLR7 et 8) et l'ADN (TLR9). Treize TLRs sont décrits chez les mammifères dont dix s'expriment dans le cœur (Takeuchi and Akira, 2010). Les TLRs sont sur-exprimés au cours de la défaillance cardiaque (Frantz et al., 1999).

Le TLR, une fois activé, transmet un signal de production de cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation de nombreux adaptateurs possédant un domaine d'homologie Toll récepteur/interleukine-1 (TIR) comme myeloid differentiation protein 88 (MYD88) et TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF). L'activation des TLRs induit une cascade de signalisation qui mène à la translocation nucléaire des facteurs de transcription comme NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) ou interferon regulatory factor (IRF) 3. La production de cytokines pro-inflammatoires est alors stimulée, en particulier l'IL-1 β et le TNF- α par NF- κ B, et l'interferon- β (IFN- β) par IRF3 (**Figure 11**). Les DAMPs et les PAMPs partagent des récepteurs tels que TLR4, suggérant des similarités dans la réponse inflammatoire infectieuse et non infectieuse.

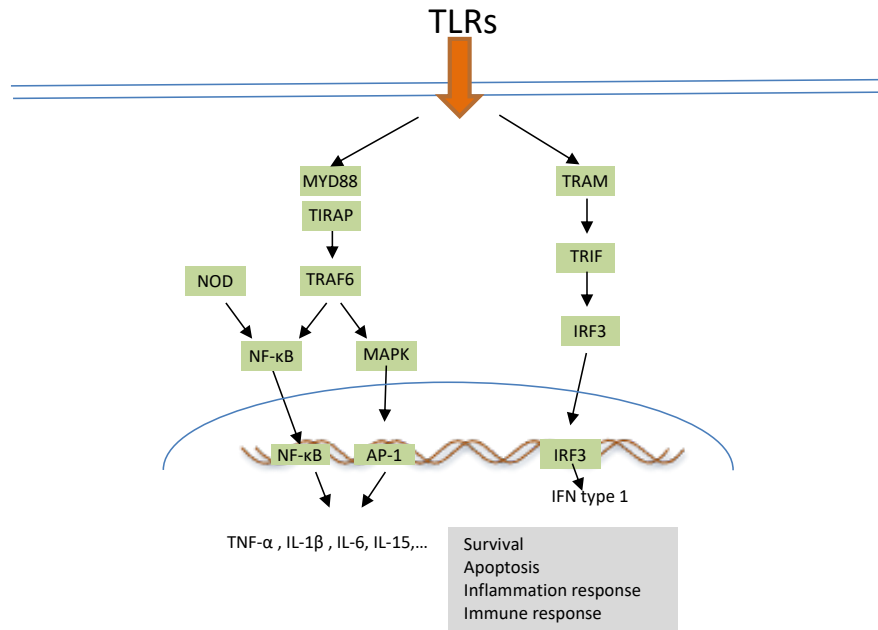


Figure 11 : La voie des récepteurs Toll-like (simplifiée). L'activation des TLRs stimule des voies de signalisation qui sont soit dépendante de myeloid differentiation factor 88 (MYD88) soit dépendante de Toll-interleukin-1 receptor-domain containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) *via* le Toll-like receptor adaptor molecule 2 (TRAM). L'activation de MYD88 ou TRIF induit la translocation nucléaire des facteurs de transcription, puis induit la transcription des cytokines pro-inflammatoires par nuclear factor- κ B (NF- κ B) ou activator protein-1 (AP-1), et d'IFN type 1 par interferon regulatory factor 3 (IRF3). La voie des récepteurs TLRs joue un rôle important dans la réponse immunitaire et inflammatoire, la survie et l'apoptose. Adaptée de Chen et al., 2017.

Le LPS, composant de la membrane cellulaire libéré par les bactéries à gram négatif, contribue majoritairement au développement du sepsis (Dunn et al., 1985) *via* le récepteur Toll-like 4 (TLR4). Chez les souris déficientes pour TLR4 injectées avec du LPS, la dysfonction myocardique n'a pas été observée, ce qui confirmerait le rôle de TLR4 dans la dysfonction myocardique septique due au LPS (Nemoto et al., 2002). Les TLRs s'expriment dans les cellules immunitaires mais également à la surface des cardiomyocytes. Il a été montré que TLR4 présent dans les leucocytes (Tavener et al., 2004), et dans les macrophages et les neutrophiles à un degré moindre, induit une dysfonction des cardiomyocytes pendant l'endotoxémie dans laquelle le TLR4, à la membrane des cardiomyocytes, n'est pas impliqué (Tavener and Kubes, 2006). Ce qui est contredit par Baumgarten et al., en 2006, qui suggèrent que TLR4 exprimé dans les cardiomyocytes contribue à leur dysfonction associée au LPS.

TLR2 est indispensable à la reconnaissance des germes à gram positif et contribue au développement de la cardiomyopathie septique dans le choc septique poly-microbien (Zou et al., 2010). En effet, une augmentation significative de la survie avec une amélioration de la fonction cardiaque *in vivo*, un raccourcissement des sarcomères et un maintien du courant

calcique enregistrés *in vitro* dans les cardiomyocytes, ont été observés chez les souris TLR2^{-/-} ayant subi une CLP (Zou et al., 2010). De plus, une régulation positive de la voie TLR2/MyD88 était associée à une dysfonction myocardique avec un mauvais pronostic chez les rats mâles ayant subi une CLP (Rudiger et al., 2013).

Durant le sepsis sévère, l'expression des HSP comme HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 est augmentée, en particulier au niveau des leucocytes polynucléaires (Hashiguchi et al., 2001). Il a été montré dans un travail *in vitro* que HSP60, ligand extracellulaire de TLR4, pourrait être responsable de l'apoptose activée par NF-κB (Kim et al., 2009). De plus, une autre DAMP comme HMGB1 joue un rôle important dans le sepsis. De graves brûlures induisent une augmentation très significative de HMGB1 dans le sérum des patients septiques, associé à une issue fatale (Huang et al., 2011). Également, on retrouve une augmentation de l'expression de HMGB1 dans le myocarde des souris septiques et dans les cardiomyocytes *in vitro* stimulés par le LPS montrant une dysfonction contractile *via* la voie TLR4/PI3Kγ (Xu et al., 2010).

2.3.3. Les récepteurs NOD-like et l'inflammasome

Chez l'homme, 22 récepteurs appartenant à la famille des récepteurs NOD-like (NLRs) ont été identifiés. Tous les NLRs sont des récepteurs cytosoliques qui contiennent un domaine central nucléotide oligomerization domain (NOD) et des domaines N-terminaux différents. NOD-1 et NOD-2 sont des protéines cytosoliques contenant des domaines N-terminaux caspase activation recruitment domain (CARD), spécifiques des peptidoglycanes bactériens, qui activent le facteur de transcription NF-κB (He et al., 2016). NLR family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) contient un domaine N-terminal pyrine qui réagit à de nombreux produits microbiens et à des substances révélatrices de dommage ou de mort cellulaire (He et al., 2016).

L'inflammasome agit comme un détecteur immunitaire inné intracellulaire. Plusieurs inflammsomes ont été identifiés, notamment NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLR-family CARD containing protein 4 (NLRC4), absent in melanoma 2 (AIM2), et l'inflammasome pyrine. À ce jour, le type d'inflammasome le mieux caractérisé et étudié est NLRP3 (Bai Baochen et al., 2020). Le complexe cytosolique composé de NLRP3 (le détecteur), d'une protéine adaptatrice et de la Caspase-1 est appelé inflammasome (**Figure 12**). Suite à la reconnaissance des DAMPs ou PAMPs, NLRP3 s'oligomériser avec une protéine adaptatrice et la forme inactive de l'enzyme Caspase-1 (pro-Casp-1) ; ceci génère la forme active de l'enzyme, qui clive le précurseur des cytokines pro-inflammatoires comme pro-IL-1β et pro-IL-18 pour libérer leur forme active. L'activation de Caspase-1 peut déclencher une mort

cellulaire hyper-inflammatoire, la pyroptose (He et al., 2016). L'inflammasome NLRP3 peut également activer la Caspase-11 ou les orthologues humains Caspase-4/Caspase-5, connu sous le nom de voie de l'inflammasome NLRP3 « non canonique » (Kanneganti et al., 2015). La cascade inflammasome a principalement été décrite dans les cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules dendritiques, mais elle est présente aussi dans d'autres cellules non immunitaires, telles que les cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques et les cellules endothéliales (Gong Chen, 2018). L'IL-1 β est une cytokine majeure de la réponse inflammatoire, elle permet le recrutement de cellules immunitaires innées au site d'infection et la modulation de cellules immunitaires adaptatives, alors que l'IL-18 est importante pour la production d'IFN- γ , la potentialisation de l'activité cytotoxique et la prolifération des lymphocytes T CD8 $^{+}$ et des cellules NK (Dinarello et al., 2009).

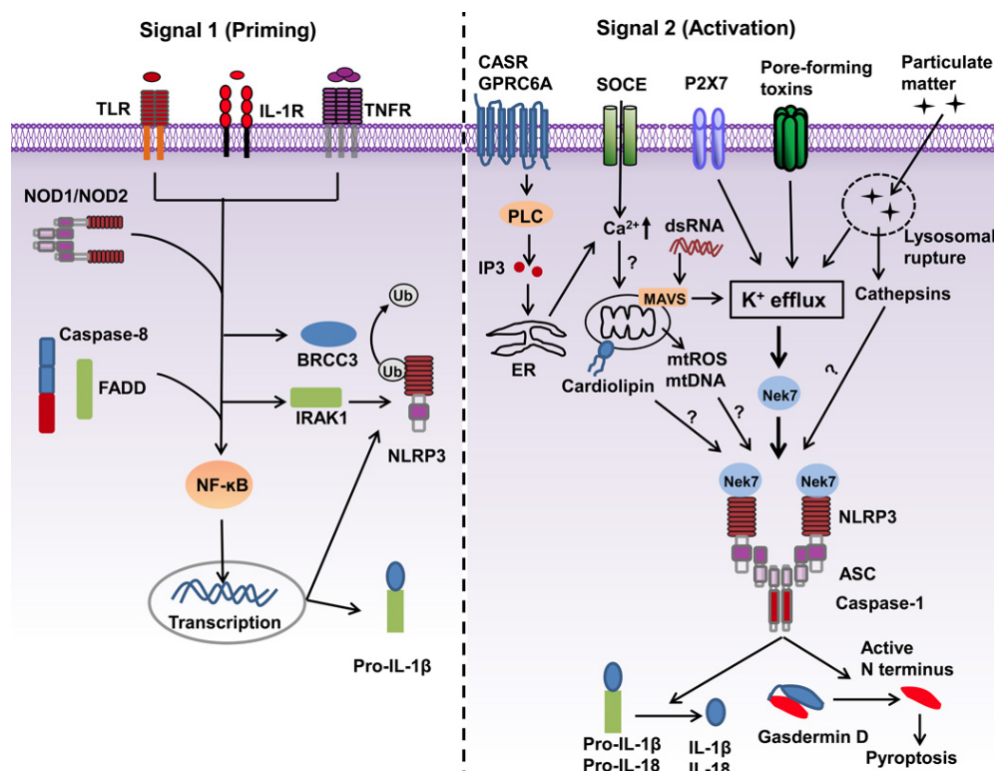


Figure 12 : L'activation de l'inflammasome NLRP3. Elle nécessite deux signaux principaux : le premier est l'engagement d'un récepteur TLR, qui induit la voie de signalisation NF- κ B, une augmentation de la transcription de NLRP3 et de précurseurs d'ILs (pro-IL-1 β ou pro-IL-18) ; le second est donné par de nombreux activateurs (l'efflux d'ions potassium, l'augmentation de calcium cytosolique, la production de ROS par la mitochondrie et la rupture lysosomale) qui facilitent l'assemblage des composants de l'inflammasome en recrutant le précurseur de la Caspase-1 dans le complexe *via* la protéine adaptatrice nommée apoptosis-associated speck like protein containing a caspase activation recruitment domain (ASC). D'après He et al., 2016.

Les récepteurs NLRs sont importants dans la réponse immunitaire pour la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs. Par contre, le rôle des NLRs dans la cardiomyopathie septique a été beaucoup moins étudié que celui des TLRs et les résultats sont contradictoires. L'expression des transcrits NLRP3 et d'IL-1 β est augmentée considérablement chez les souris mâles ayant subi une CLP. De plus, les souris NLRP3^{-/-} montrent une diminution des cytokines plasmatiques telles que l'IL-6 et IL-1 β et une diminution de dysfonction cardiaque après CLP (Busch et al., 2016). Cependant, dans une étude récente, la délétion génétique de TLR4, de NLRP3 ou de Caspase-1, n'a pas amélioré la fonction cardiaque chez les souris mâles septiques après CLP malgré une réduction des cytokines pro-inflammatoires (Alarcón et al., 2018).

2.3.4. La signalisation inflammatoire

a) La voie NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle important dans la réponse inflammatoire et immunitaire, la prolifération, et l'apoptose (**Figure 11**) (Liu and Malik, 2006). La famille NF- κ B comprend cinq facteurs de transcription apparentés : p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB et c-Rel. Dans des conditions physiologiques, NF- κ B est ubiquitaire et séquestré dans le cytoplasme par l'inhibiteur de κ B (I κ B), ce qui empêche son activation et inhibe son accumulation nucléaire. Un stimulus activateur (substances dérivées de pathogènes, cytokines, stress oxydant, ...) libère NF- κ B par phosphorylation, ubiquitination et dégradation d'I κ B. NF- κ B peut alors pénétrer dans le noyau, où il forme généralement un hétérodimère p50/p65, se lie aux promoteurs ou aux enhancers de nombreux gènes cibles. De ce fait, il participe à l'activation de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée et inflammatoire, tels que ceux codant pour les cytokines pro-inflammatoires et leurs récepteurs, les cyclooxygénases (COX), les radicaux libres oxygénés, les espèces réactives nitrogènes (RNS), les chimiokines et les molécules d'adhésion (Liu and Malik, 2006).

b) La voie JAK/STAT

La voie Janus-kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) a été découverte au cours des études sur les effets des interférons (Schroder et al., 2004). Elle est maintenant connue comme la voie d'activation de nombreuses cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-15, et des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires (O'Shea et al., 2015). Quatre JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques et sept facteurs de transcription STAT (STAT1,

STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, and STAT6) sont actuellement identifiés (O'Shea et al., 2015).

Le signal *via* la voie JAK/STAT est initié lorsqu'un ligand (par exemple des cytokines, des facteurs de croissance, des hormones) se lie à son récepteur (**Figure 13**). Une fois activées, les kinases JAK stimulent la phosphorylation des protéines STAT qui induisent alors la transcription de gènes cibles. La dérégulation de la voie JAK/STAT est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires, auto-immunes et cardiovasculaires (O'Shea et al., 2015). Il a été démontré que la voie JAK/STAT est liée à la libération de diverses cytokines et médiateurs lors de la régulation de la réponse immunitaire au cours du sepsis (Cai et al., 2015). Il a été trouvé une régulation positive de la voie JAK/STAT, associée à une dysfonction myocardique avec un mauvais pronostic chez les rats mâles ayant subi une CLP (Rudiger et al., 2013).

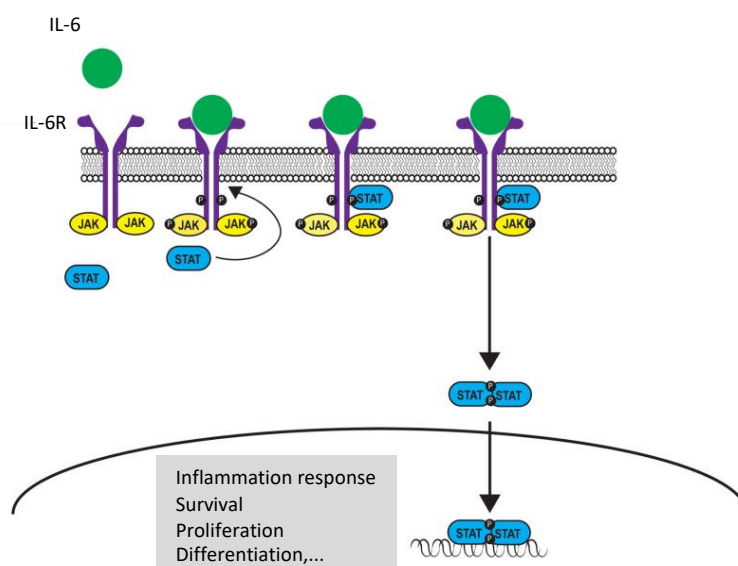


Figure 13 : La voie JAK/STAT. La cytokine IL-6 par exemple se lie à son récepteur IL-6R, conduit au recrutement de JAKs qui phosphorylent le récepteur et eux-mêmes ; JAK activé stimule la phosphorylation de STAT qui peut alors former des homo/hétérodimères. Les dimères de STAT phosphorylés migrent dans le noyau pour réguler la transcription des gènes pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion intracellulaires. D'après O'Shea et al., 2015.

Le récepteur à l'IFN- γ (IFNGR) est exprimé dans la plupart des cellules nucléées. Le récepteur est composé de deux sous-unités, IFNGR1 et IFNGR2. IFNGR1 est responsable de la liaison au ligand, IFNGR2 augmente l'affinité d'IFNGR1 pour son ligand, améliore la stabilité du complexe et est obligatoire pour la transduction de signal de l'IFN- γ (Schroder et al., 2004). La voie de signalisation classique de l'IFN- γ est la voie JAK/STAT (**Figure 13**). Après la liaison au ligand, la signalisation de l'IFN- γ est initiée par l'autophosphorylation de JAK2, qui

phosphoryle ensuite JAK1. JAK1 activé phosphoryle IFNGR1, fournissant un site d'amarrage pour STAT1, qui est également activé par la phosphorylation par JAK2. STAT1 se dissocie ensuite du récepteur IFN- γ et pénètre dans le noyau pour se lier aux régions promotrices des gènes inductibles par l'IFN- γ (**Figure 13**).

c) La voie des MAP kinases

La famille des mitogen-activated protein (MAP) kinases est une famille de protéines sérine/thréonine kinases qui dirigent les réponses cellulaires suite à différents stimuli comme le stress osmotique, les mitogènes, le choc thermique, et les cytokines inflammatoires (telles que IL-1, TNF- α et IL-6) (Chen et al., 2017). Les trois voies principales des MAP kinases, définies par les derniers éléments de la cascade qui comportent tous plusieurs isoformes, sont les voies des kinases les extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1 et ERK2, de p38 MAP kinases et de C-Jun N-terminal kinases (JNK1, JNK2 et JNK3). Chaque voie de signalisation des MAP kinases comprend au moins trois composants : une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK), et une MAPK kinase kinase (MAPKKK). MAPKK phosphoryle et active les MAPKK, qui à leur tour phosphoryle et active les MAPK. Les MAP kinases ont une expression ubiquitaire et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. ERK1 et ERK2 régulent habituellement la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Les MAP kinases p38 et c-JUN sont impliquées dans la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, ou le remodelage de la matrice extracellulaire (Zhang and Liu, 2002) (**Figure 14**).

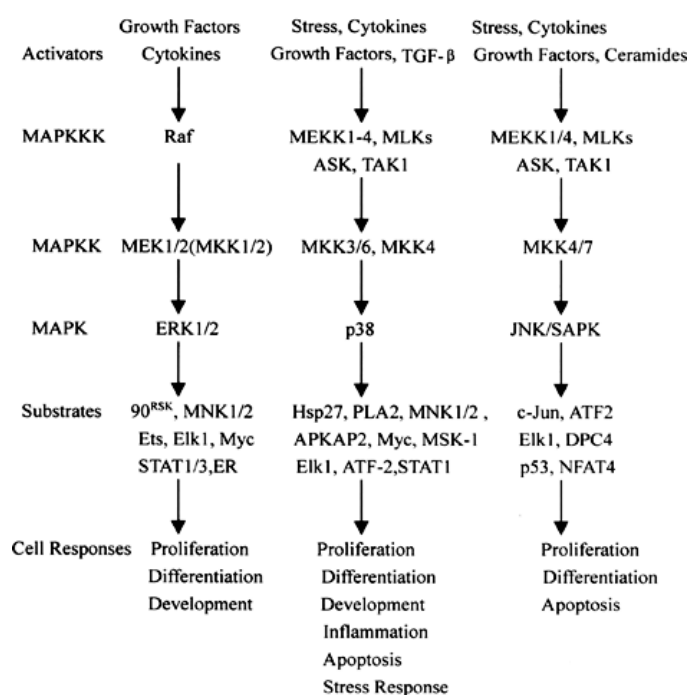


Figure 14 : Principales cascades de MAP kinases dans les cellules de mammifères. Dans les cellules de mammifères, la stimulation par le stress, les facteurs de croissance ou les cytokines provoque l'activation des mitogen-activated protein (MAP) kinases. Au moins trois familles des MAP kinases ont été caractérisées : kinase régulée par signal extracellulaire (ERK), Jun kinase (JNK/SAPK) et p38 MAPK. Chaque voie de MAP kinases est constituée d'au moins trois enzymes qui sont activées en série : une MAPK kinase kinase (MAPKKK), une MAPK kinase (MAPKK) et une MAP kinase (MAPK). La voie des MAP kinases joue un rôle clé dans la transduction des signaux extracellulaires vers les réponses cellulaires : la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement, les réponses inflammatoires et l'apoptose. D'après Zhang and Liu, 2002.

d) Les cytokines pro- et anti-inflammatoires

Les cellules dendritiques et les macrophages sont les sources majeures de cytokines. Les cytokines sont sécrétées en petite quantité en réponse à un stimulus externe et se lient à des récepteurs de haute affinité sur les cellules cibles. La plupart des cytokines agissent sur les cellules qui les produisent (activité autocrine) ou sur les cellules voisines (activité paracrine). Lors de l'infection, les cellules dendritiques et les macrophages sont fortement activés et produisent de grandes quantités de cytokines qui agissent à distance de leur site de sécrétion (activité endocrine) (Andrew H. Lichtman et al.,). Le **Tableau 2** présente les principales cytokines inflammatoires et leur fonction.

Les cytokines ont des fonctions variées dans la défense de l'hôte. Le TNF- α , l'IL-1 et les chimiokines sont les principales cytokines participant au recrutement des neutrophiles et des monocytes sanguins. Les cytokines modulent la réponse immunitaire et inflammatoire *via* un réseau complexe d'interactions. Cependant, une production excessive de cytokines inflammatoires peut conduire à des dommages tissulaires, des défaillances cellulaires et une dérégulation moléculaire qui peuvent déclencher une dysfonction d'organes (Rittirsch et al., 2008).

Cytokines	Main sources	Major function
IL-1	Macrophages, monocytes, endothelial cells	Pro-inflammation, prolifération, apoptosis, differentiation
IL-6	Macrophages, T cells, endothelial cells	Pro-inflammation, differenciation, IgG production

IL-10	Macrophages, T cells, B cells	Anti-inflammation, inhibits cytokine production, decrease costimulateur expression
IL-15	Macrophages	Pro-inflammation, proliferation
IL-18	Macrophages	Pro-inflammation, IFN- γ production
IL-12	Dendritic cells, macrophages	Pro-inflammation, differenciation, IFN- γ production
TNF- α	Macrophages, monocytes, T cells	Pro-inflammation, cell proliferation, apoptosis
IFN- α	Dendritic cells, macrophages	Pro-inflammation, anti-viral
IFN- β	Fibroblasts	Pro-inflammation, anti-viral, anti-proliferative
IFN- γ	T-cells, NK cells	Pro-inflammation, Anti-viral, macrophage activation, increases neutrophil and monocyte function, MHC-I and -II expression on cells
Chemokines	Macrophages, monocytes, T cells, endothelial cells, fibroblasts	Pro-inflammation, chemotaxis, angiogenesis
TGF- β	Macrophages, T cells	Anti-inflammation, inhibition T and B cell proliferation

Tableau 2 : Fonction des principales cytokines. A noter : l'IFN- γ , l'IL-10 et le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) sont des cytokines à la fois de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Adapté de Turner et al., 2014.

L'activation du facteur de transcription NF- κ B permet la transcription d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Deux médiateurs principaux sont liés à la dysfonction cardiaque : IL-1 β et TNF- α .

Des auteurs ont identifié la présence d'une substance circulante liée à la dysfonction myocardique dans le sérum des patients en choc septique, avec fraction d'éjection ventriculaire gauche inférieure à 40% (Parrillo et al., 1985). Le sérum de ces patients, prélevé au cours de la phase aiguë et non pas au cours de la période de récupération, diminue significativement la contraction des cardiomyocytes *in vitro* en réduisant l'amplitude du raccourcissement (Parrillo et al., 1985). Kumar et al., 1996 ont montré que l'administration d'IL-1 β et de TNF- α , extraits du sérum des patients en choc septique, agissent de manière synergique sur la réduction du raccourcissement des cardiomyocytes *in vitro*. En effet, la suppression de ces cytokines du sérum par immuno-absorption permet d'améliorer la fonction myocardique. Par ailleurs, ils ont montré que les autres médiateurs de l'inflammation comme IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-8 et IFN- γ n'avaient aucun impact sur la contractilité des cardiomyocytes en culture (Kumar et al., 1996). Ceci est contredit dans une autre étude où les auteurs ont trouvé que les cytokines IL-6, IL-8 et IL-10 du sérum des patients en choc septique pourraient participer à la dysfonction myocardique septique des cardiomyocytes *in vitro* (Joulin et al., 2007). La synthèse de TGF- β , une cytokine immunomodulatrice avec des effets anti-inflammatoires multiples permet de corriger la dysfonction contractile des cardiomyocytes *in vitro* induite par IL-1 β , TNF- α , ou le sérum de patients en choc septique (Kumar et al., 2007).

Par ailleurs, il a été montré une régulation négative de l'expression des récepteurs α -adrénergiques (α -AR) pendant le choc septique, associée à une augmentation massive des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α , probablement une conséquence de l'activation de la voie NF- κ B (Bucher et al., 2003). Il a été proposé que la régulation négative des α -AR contribue à l'hypovasoactivité et favorise par la suite l'insuffisance circulatoire.

e) L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO), petite molécule très réactive avec une demi-vie de quelques secondes, est produit dans tous les types de cellules cardiaques et induit une multitude d'effets dans l'homéostasie cardiovasculaire (Liu et al., 2017). Le NO est synthétisé par la NO synthase (NOS). Trois isoformes de NOS ont été identifiées dans les cellules myocardiques : NOS neuronale (nNOS) et NOS endothéliale (eNOS) sont les formes constitutives, et NOS inducible (iNOS) est induite par les cytokines pro-inflammatoires. La eNOS, localisée sur le sarcolemme, inhibe l'entrée de calcium dans le cytoplasme en agissant sur le canal calcique de type L, ce qui provoque la relaxation du myocarde (Saraiva and Hare, 2006). Le NO produit par iNOS dans le réticulum sarcoplasmique, nitrosyle les récepteurs à la ryanodine RYR2 et RYR3, et

provoque la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol. Il induit ainsi la contraction du cardiomyocyte (Saraiva and Hare, 2006).

Lors d'un choc septique, eNOS joue un rôle protecteur. Ichinose et al., 2007 ont montré qu'une sur-expression, par injection de LPS, de la eNOS spécifique des cardiomyocytes protège les souris mâles septiques d'un dysfonctionnement cardiaque et de la mort. Dans cette étude, il a été démontré que l'augmentation de NO myocardique atténue la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par les endotoxines, augmente la charge en calcium du réticulum sarcoplasmique et la sensibilité des myofilaments au calcium. Par contre, van de Sandt et al., 2013 ont montré que eNOS induit une dysfonction myocardique au cours du sepsis. Chez les souris eNOS^{-/-} septiques par CLP, une meilleure survie avec une fonction hémodynamique stable a été retrouvée.

L'expression d'iNOS augmente dans les cardiomyocytes de souris en cas de septicémie, entraînant une production importante de NO responsable du développement d'un dysfonctionnement systolique et diastolique. Dans les souris iNOS^{-/-}, la perfusion d'endotoxine affectait moins la fonction myocardique comparé aux souris contrôles (Ullrich et al., 2000). Le NO est associé à la dysfonction mitochondriale, à une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires, et à une sous-régulation des récepteurs β -adrénergiques qui contribuent à la dysfonction myocardique (Rudiger and Singer, 2007).

La dysfonction mitochondriale a une place centrale dans la physiopathologie cardiaque septique. Le NO et les ROS contribuent de manière significative à la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, causée par l'inhibition de la phosphorylation oxydative et de la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Suzuki et al., 2017).

Dans le lapin septique par CLP, l'activation des cellules endothéliales augmente la production du NO, de l'endothelin 1 (EDN1) et de prostaglandines, qui ont des effets régulateurs paracrines sur la fonction cardiaque (Mebazaa et al., 2001). Chez les patients en sepsis sévère, les dysfonctions systoliques des ventricules gauche et droit sont associées aux marqueurs de dysfonction endothéliale comme EDN1 et le Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) (Furian et al., 2012).

f) Les voies de l'apoptose

Durant le choc septique, il a été montré qu'une activation de la Caspase-3, pro-apoptotique, participe directement à la dysfonction ventriculaire gauche. Cette dysfonction est liée à des défauts de la régulation du calcium intracellulaire et à la sensibilité au calcium des

myofilaments (Neviere et al., 2010). De plus, les interactions entre les récepteurs des estrogènes et les récepteurs adrénergiques pourraient également moduler l'apoptose *via* la voie phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) (J.O. Machuki et al., 2018).

Le macrophage migration inhibitory factor (MIF) et le TNF- α sont des facteurs à l'origine de l'activation des Caspases. Le MIF participe aussi à l'activation des voies MAP kinase, ce qui favorise le processus d'apoptose mitochondriale. La signalisation gérée par les MAPK tient une place centrale dans l'apoptose. Cette voie participe à l'apoptose lors de l'ischémie/reperfusion durant le choc septique ou l'ischémie coronarienne (Obata et al., 2000).

Des études récentes ont montré que les médiateurs, y compris les ROS et le cytochrome C, libérés par les mitochondries pendant la mort cellulaire, pourraient induire une inflammation supplémentaire (Rudiger and Singer, 2007).

2.4. Dimorphisme sexuel

Il existe un dimorphisme sexuel dans la réponse au sepsis. L'incidence du sepsis semble plus élevée chez les hommes. Une étude rétrospective portant sur 30 288 patients a retrouvé une incidence plus élevée des pneumonies chez les patients de sexe masculin hospitalisés à la suite d'un traumatisme sévère (Gannon et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ne retrouvaient pas de différence de mortalité en fonction du sexe. Cependant, d'autres études semblent indiquer que le genre sexuel affecte également le pronostic du sepsis. L'analyse des données de 261 255 patients de la cohorte l'Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) retrouvait une augmentation du taux de mortalité chez les patients de sexe masculin de moins de 50 ans, comparé aux patients de sexe féminin du même âge. Cette différence n'était pas retrouvée chez les patients de plus de 50 ans, ce qui pourrait indiquer une influence du statut hormonal (Mahmood et al., 2012). Une étude prospective portant sur 2 183 patients atteints de pneumonie communautaire retrouvait cependant une survie plus faible chez les hommes de plus de 50 ans (Reade et al., 2009). Une augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires TNF- α , IL-6, IL-10 ainsi que de marqueurs de la coagulation (antithrombine III et facteur IX) et de la fibrinolyse (D-dimères) était retrouvée chez les hommes avec une pneumonie dans cette étude. De manière similaire, l'analyse de 373 370 patients aux Etats-Unis a identifié le genre masculin comme variable pronostique indépendante dans le sepsis grâce à une analyse multivariée (Kisat et al., 2013).

Des études cliniques ont montré que la stimulation par le LPS ou l'acide lipotéichoïque chez les femmes en bonne santé entraînait une baisse des taux de TNF- α et d'IL-6 dans le sang par rapport aux hommes (Aulock et al., 2006). Les patientes de sexe féminin atteintes d'un sepsis après une chirurgie avaient un taux de survie plus élevé, associé à une élévation de la cytokine anti-inflammatoire plasmatique IL-10, comparé aux individus de sexe masculin du même âge (Schröder et al., 1998).

Dans les modèles animaux, une meilleure survie a été observée chez des souris femelles en âge de procréer après induction d'un sepsis par CLP comparé aux souris mâles (Zellweger et al., 1997). Diodato et al., 2001 ont étudié l'effet du sexe sur la survie après hémorragie suivie d'un sepsis par CLP chez la souris. Les auteurs ont retrouvé une mortalité plus élevée associée à une augmentation des cytokines plasmatiques comme IL-6 et TNF- α chez les mâles, alors qu'il n'existe pas de différences chez les femelles.

En résumé, ces études suggèrent que le sexe masculin est un facteur de risque de développement d'un sepsis, alors que le sexe féminin serait protecteur et augmenterait la survie. De manière intéressante, cette différence ne semble être présente que chez les patients de moins de 50 ans, ce qui suggère un mécanisme lié aux hormones sexuelles femelles, avec une perte de cet effet protecteur chez les femmes ménopausées. Cependant, certaines études ont retrouvé des résultats contradictoires qui pourraient être expliqués notamment par le rôle des hormones sexuelles plutôt que celui du genre en lui-même. La non prise en compte du statut hormonal chez les femmes, en fonction du cycle menstruel et de l'âge, pourrait être à l'origine d'un biais dû à une différence de concentration des hormones dans le plasma.

Ainsi, de plus en plus d'études révèlent des différences entre mâle et femelle dans les maladies cardiovasculaires (Leinwand, 2003 ; Theuring et al., 2018) et dans la réponse immunitaire (Angele et al., 2014; Textoris et al., 2010; Zhu et al., 2009). Cependant, il existe peu d'études sur la dysfonction cardiaque liée au sepsis en fonction du sexe.

Dans des souris septiques, des auteurs ont montré que les performances cardiaques étaient plus altérées chez les mâles que chez les femelles 4h après l'injection de LPS. Ils ont retrouvé que l'activation de Rac family small GTPase 1 (RAC1) pendant l'endotoxémie augmente l'activité de la NADPH oxydase et la phosphorylation de ERK1/2/p38 MAPK pour aboutir finalement à l'expression du TNF- α au niveau cardiaque. L'administration de 17- β -œstradiol atténue cette dysfonction myocardique par une réduction de l'activation de RAC1, ce qui pourrait réduire l'effet délétère potentiel de l'expression myocardique du TNF- α (Zhu et al., 2009). Dans une étude plus récente, il a été montré que le sepsis provoquait une dysfonction cardiaque chez les

individus des deux sexes. Cependant, la dysfonction cardiaque était significativement moins prononcée chez les souris femelles que chez les mâles après induction d'un sepsis par LPS pendant 18h ou par CLP pendant 24h (Chen et al., 2014). La protection cardiaque chez les individus femelles lors du sepsis était associée à l'activation de la voie de survie AKT/eNOS, à la diminution de l'activation de NF- κ B et à la diminution de l'expression de iNOS, TNF- α et IL-6 (Chen et al., 2014).

La dérégulation des transitoires calciques associée à la dysfonction myocardique septique est bien étudiée chez les animaux mâles, cependant elle reste peu connue chez les femelles (Hobai et al., 2015). Ces auteurs ont montré que la réduction du raccourcissement des sarcomères dans les cardiomyocytes, après ajout de LPS, est moins sévère chez les femelles que chez les mâles, et est partiellement médiée par la libération de cGMP généré par l'enzyme guanylyl cyclase soluble. Chez les mâles, cette dysfonction est indépendante du cGMP (Hobai et al., 2016).

L'interaction entre les récepteurs aux œstrogènes et les récepteurs adrénergiques pourrait affecter la contraction cardiaque en régulant l'expression des protéines liées au calcium intracellulaire (J. O. Machuki et al., 2018). Une augmentation de l'expression des β 1-AR, du canal calcique de type L, et une diminution de NCX ont été observées chez les rates ovariectomisées sans modification de l'expression de SERCA et du PLB (Chu et al., 2006).

Les récepteurs aux œstrogènes activent les protéines Gi entraînant un effet anti-apoptotique *via* la voie PI3K/AKT (J.O. Machuki et al., 2018). *In vitro*, l'ajout de 17- β -œstradiol et la sur-expression de son récepteur augmentent la survie des cardiomyocytes traités par LPS. Cet effet cardioprotecteur est associé à l'activation de la voie PI3K/AKT afin d'inhiber l'expression du TNF- α , l'activation de JNK et NF- κ B (Liu et al., 2009).

Pour résumer, plusieurs études ont montré que le sexe influence le pronostic et la survie des patients au cours du sepsis et du choc septique, par l'intermédiaire d'une modulation des réponses immunitaires et cardiovasculaires (**Figure 15**). Cette modulation semble liée à l'action des hormones sexuelles, avec un effet protecteur des hormones sexuelles femelles sur la fonction myocardique. Les mécanismes précis concernant le rôle des hormones sexuelles lors de la dysfonction myocardique sont cependant encore mal compris. Il est donc essentiel de préciser ce rôle afin d'ouvrir le champ de nouvelles possibilités thérapeutiques lors du sepsis en visant les hormones sexuelles. De plus, à l'heure de la médecine personnalisée, la mise en évidence de différences de réponse en fonction du sexe à un traitement prometteur, le β 1-bloquant sélectif, rend essentiel la compréhension des mécanismes à l'origine de cette différence, afin de mieux préciser la population qui pourrait bénéficier de ce traitement.

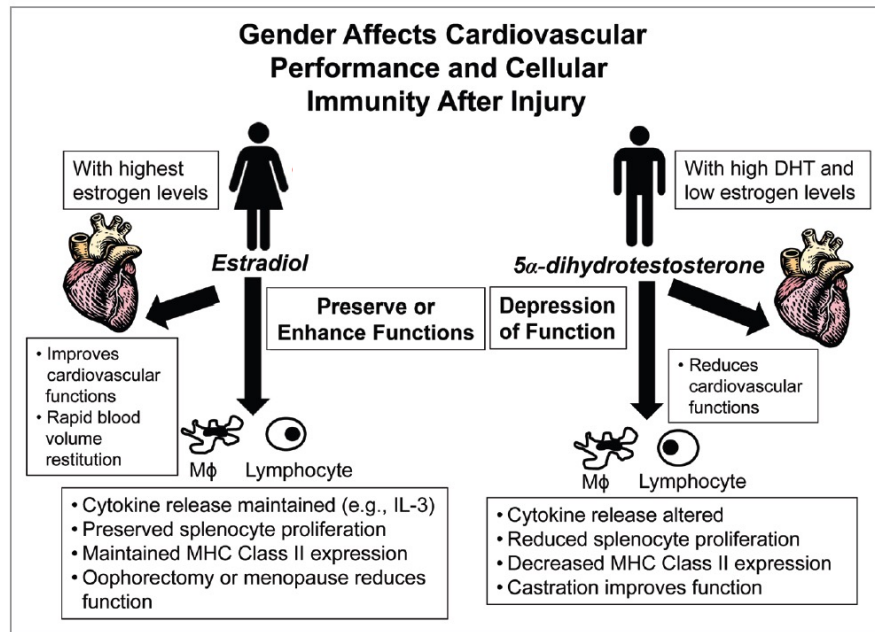


Figure 15 : Illustration schématique de l'effet du sexe sur les performances cardiovasculaires et la réponse immunitaire après une défaillance cardiaque. Le dimorphisme sexuel dans la réponse cardiovasculaire a été observé lors d'un sepsis, avec un effet protecteur du sexe féminin et un effet dépresseur du sexe masculin sur la fonction myocardique. Cette différence semble être liée à l'action des hormones sexuelles, avec un effet plutôt délétère des hormones sexuelles masculines sur la réponse immunitaire et un effet protecteur des hormones sexuelles femelles en améliorant cette réponse immunitaire. D'après Angele et al., 2014.

3. La myocardite immuno-induite

3.1. Rôle physiologique des points de contrôle immunitaire

Les lymphocytes T jouent un rôle central en tant que modulateurs et effecteurs du système immunitaire. Les lymphocytes T naïfs, provenant du thymus, recirculent dans les organes lymphoïdes secondaires où les antigènes provenant du sang ou des tissus blessés sont collectés et présentés aux cellules T (Grabie et al., 2019). Les cellules T naïves reconnaissent l'antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigène (APC) et sont activées *via* l'interaction entre le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) sur les APC et le récepteur des cellules T (TCR) (**Figure 16A**). D'autres signaux de co-stimulation sont nécessaires pour l'activation des cellules T. Le CD28 est un co-récepteur exprimé sur les cellules T. La liaison des molécules CD80 (également appelées B7-1) ou CD86 (également appelées B7-2) sur les APC, avec les molécules CD28 des cellules T, leur fournit le signal d'activation entraînant leur expansion clonale et leur différenciation en cellules effectrices T (Th) auxiliaires CD4⁺ ou en lymphocytes

T cytotoxiques CD8⁺. Les cellules T auxiliaires sont essentielles pour générer des réponses spécifiques contre les agents pathogènes extracellulaires, ce sont les T helper 2 (Th2) ou intracellulaires, les Th1. Les lymphocytes T CD8⁺ tuent les cellules cibles, telles que les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.

Afin de rester auto-tolérants, de moduler la durée et le degré de la réponse immunitaire, d'empêcher une activation immunitaire excessive dans les tissus périphériques, ces signaux sont régulés par des points de contrôle immunitaire tels que cytotoxique T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4), programmed cell death 1 (PD-1) et programmed death-ligand 1 (PD-L1) (Chen and Flies, 2013).

CTLA-4 est un co-récepteur inhibiteur exprimé sur les cellules T activées. Il inhibe les cellules T en compétition avec CD28 pour se lier aux ligands B7. CTLA-4 est homologue à CD28 mais il a une affinité de liaison beaucoup plus élevée pour le ligand B7. Dans les cellules T naïves au repos, CD28 est exprimé de manière constitutive à la surface cellulaire, CTLA-4 est localisé principalement dans les vésicules intracellulaires. L'expression à la membrane des cellules T de CTLA-4 est augmentée en réponse à l'activation du TCR. Plus le signal du TCR est fort, plus la translocation de CTLA-4 à la surface cellulaire est importante afin d'inhiber l'activation nocive des cellules T (Buchbinder and Desai, 2016).

PD-1 est un autre récepteur inhibiteur qui joue un rôle important dans la régulation des lymphocytes T (Buchbinder and Desai, 2016). PD-1 est faiblement exprimé dans les cellules immunitaires au repos. Cependant, lors de l'activation, PD-1 est sur-exprimé à la surface des cellules T, des cellules B, des cellules dendritiques et des macrophages. PD-L1, un ligand de PD-1, est exprimé à la fois sur les cellules lymphoïdes et non lymphoïdes, y compris les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les cellules tumorales (EPPIHIMER et al., 2002; Grabie et al., 2007). PD-L2, autre ligand de PD-1, est exprimé principalement sur les APC tels que les macrophages et les cellules dendritiques. PD-L1 et PD-L2 sont tous deux sur-exprimés par des cytokines, notamment les interférons, le TNF et le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) (Hu et al., 2019). La signalisation PD-L1/PD-1 inhibe la prolifération des cellules T et la production de cytokines, et réduit la survie des cellules T (Tajiri and Ieda, 2019).

3.2. Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICIs) et traitements anticancéreux

Le cancer est caractérisé par des mutations génétiques qui conduisent à l'expression de néoantigènes. Les APC présentent ces antigènes *via* des molécules de MHC exprimées à leur surface, qui interagissent avec les TCR. Les cellules T reconnaissent ces antigènes comme « non-soi » et les attaquent. Cependant, les cellules tumorales peuvent échapper à la surveillance immunitaire en diminuant la réponse immunitaire (Mohme et al., 2017). En effet, les cellules tumorales peuvent réguler positivement l'expression de PD-L1 en augmentant la concentration d'IFN- γ dans le microenvironnement tumoral. La liaison de PD-L1 à PD-1 sur les cellules T inactive les cellules T permettant ainsi aux cellules tumorales d'échapper à l'attaque du système immunitaire (**Figure 16A**).

La découverte des points de contrôle immunitaire, connus comme régulateurs négatifs des lymphocytes T, a orienté les recherches sur le ciblage potentiel de ces molécules pour potentialiser la réponse des lymphocytes T contre les cellules tumorales. Ainsi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre ces points de contrôle immunitaire permet de bloquer l'inactivation des lymphocytes T qui sont alors de nouveau en mesure d'attaquer les cellules tumorales (**Figure 16B**). Le traitement du mélanome métastatique par l'anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab) a été approuvé en 2011, et les anticorps anti-PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) ont été approuvés en 2014. Actuellement, il existe sept inhibiteurs des points de contrôle (ICIs) : ipilimumab (anti-CTLA-4) ; nivolumab, pembrolizumab et Cemiplimab (anti-PD-1) ; et l'atezolizumab, l'avelumab et le durvalumab (anti-PD-L1) (**Tableau 3**). L'utilisation de thérapies combinées, comme l'ipilimumab et le nivolumab, a également été approuvée (Hu et al., 2019).

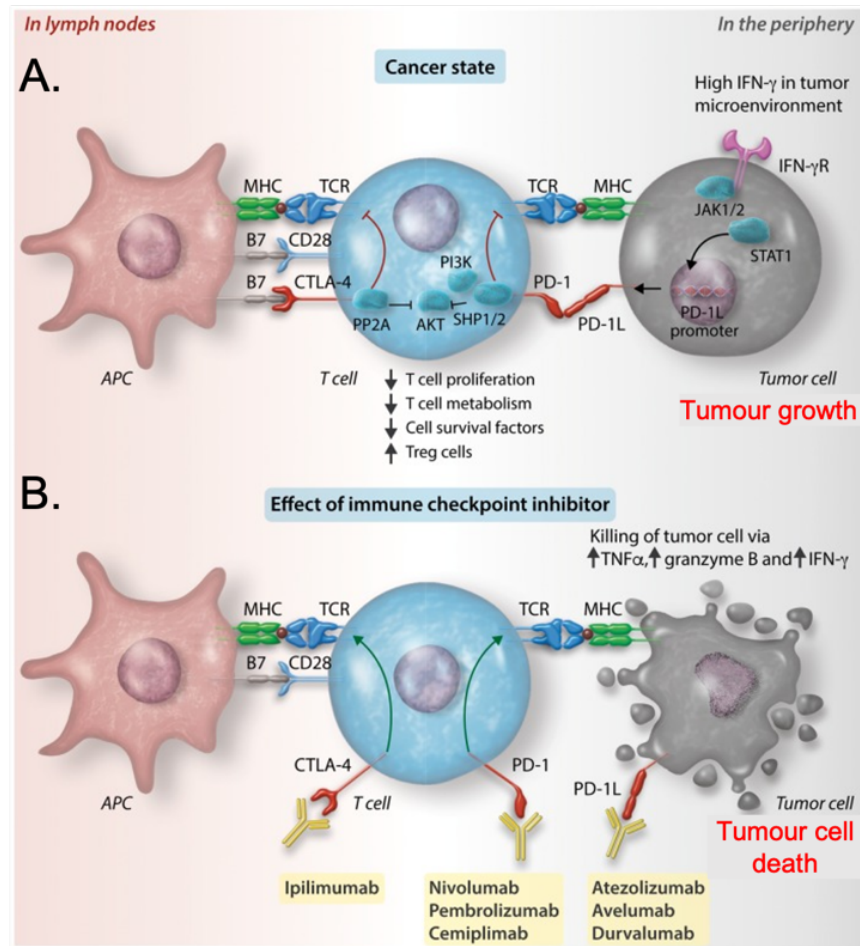


Figure 16 : Rôle physiologique des points de contrôle immunitaire et effet de leurs inhibiteurs dans la régulation de la réponse immunitaire aux traitements anticancéreux. *Activation de la réponse des cellules T* : Les néoantigènes des cellules tumorales sont capturés par des APC et présentés sur les molécules du MHC. Les cellules T reconnaissent les complexes néoantigène-MHC dans le ganglion lymphatique, sont activées et migrent vers le microenvironnement tumoral. L'activation des lymphocytes T nécessite des signaux de co-stimulation médiés par l'interaction entre B7 et CD28. *Inactivation de la réponse des cellules T* : La liaison entre des points de contrôle immunitaires le cytotoxique T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4), le programmed cell death 1 (PD-1) avec leurs ligands B7 et PD-L1 conduit à l'inhibition de AKT. L'inhibition d'AKT entraîne une diminution de la prolifération, du métabolisme des cellules T, de la survie des cellules T et une augmentation de la prolifération des cellules T régulatrices. **(A)** *Les cellules tumorales échappent à la surveillance immunitaire en favorisant l'activation des points de contrôle* : Une grande concentration d'IFN- γ dans microenvironnement tumoral conduit une sur-expression de PD-L1 et/ou PD-L2 dans les cellules tumorales via l'activation de la voie JAK/STAT. PD-L1 se lie au récepteur PD-1 présent sur les lymphocytes T inhibe la réponse de cellules T et favorise la prolifération des cellules tumorales. **(B)** *Les inhibiteurs de points de contrôle stimulent l'activation des lymphocytes T* : Les points de contrôle immunitaires peuvent être bloqués par des anticorps monoclonaux dirigés contre CTLA-4 (ipilimumab), PD-1 (nivolumab, pembrolizumab et cemiplimab) et PD-L1 (atezolizumab, avelumab et durvalumab). Le blocage de ces points de contrôle immunitaires restaure la réponse immunitaire des lymphocytes T contre les cellules tumorales. Le TNF- α , le granzyme B et l'IFN- γ sont libérés, entraînant la mort des cellules tumorales. Modifié d'après Hu et al., 2019.

Cible	Inhibiteur de point de contrôle	Indication
CTLA-4	Ipilimumab (Yervoy)	Mélanome, carcinome à cellules rénales, cancer colorectal
PD-1	Nivolumab (Opdivo)	Mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, carcinome rénal, lymphome de Hodgkin, cancer épidermoïde de la tête et du cou, carcinome urothélial, cancer colorectal, carcinome hépatocellulaire
	Pembrolizumab (Keytruda)	Mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, cancer du poumon à petites cellules, cancer de la tête et du cou, lymphome de Hodgkin, lymphome à grandes cellules B, carcinome urothélial, cancer colorectal, cancer de l'estomac, cancer de l'œsophage, cancer du col de l'utérus, carcinome hépatocellulaire, Carcinome à cellules de Merkel, carcinome à cellules rénales
	Cemiplimab (Libtayo)	Carcinome épidermoïde cutané
PD-L1	Atezolizumab	Carcinome urothélial, cancer du poumon non à petites cellules
	Avelumab	Carcinome à cellules de Merkel
	Durvalumab	Carcinome urothélial

Tableau 3 : Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire actuellement approuvés par l'administration des aliments et des médicaments. Modifié d'après Hu et al., 2019.

3.3. La myocardite induite par l'immunothérapie aux ICIs

Si le rôle central de points de contrôle immunitaire est de maintenir l'auto-tolérance, le blocage des points de contrôle immunitaire peut donc induire des événements indésirables. Ainsi, ces complications sont retrouvées chez plus de 50% des patients cancéreux traités par ICIs et peuvent toucher presque tous les organes (Grabie et al., 2019). La majorité des complications peuvent être gérées pour que les patients puissent bénéficier de tout le potentiel de l'immunothérapie en toute sécurité. Cependant, des complications beaucoup plus graves, touchant le système cardiovasculaire, peuvent subvenir. Ces cardiotoxicités possèdent le plus fort taux de létalité et nécessitent une vigilance particulière pour les dépister et les prendre en

charge rapidement (Wang et al., 2018). Les effets secondaires peuvent être liés à la toxicité directe sur le système cardiovasculaire ou à une autre toxicité, rénale, endocrinienne, hépatique ou pulmonaire par exemple, qui retentit secondairement sur la fonction cardiaque (Johnson et al., 2016).

Myocardites, péricardites, vascularites, troubles du rythme et syndromes coronariens aigus sont les principales manifestations cliniques décrites au cours de ces cardiotoxicités (**Figure 17**). Les événements indésirables cardiaques les plus courants liés aux ICI sont les myocardites avec une incidence de 0.27% à 1.14% (Hu et al., 2019). Cette incidence atteint 2.4% lors de la thérapie combinée nivolumab (anti-PD-1) et ipilimumab (anti-CTLA-4) (Mahmood et al., 2018). Bien que rares, les myocardites présentent une évolution péjorative pour un tiers des patients avec un taux de létalité pouvant atteindre 50% (Mahmood et al., 2018).

Une infiltration de lymphocytes T ($CD8^+$, $CD4^+$) et de macrophages ($CD68^+$) dans le myocarde est observée dans la myocardite fulminante associée au traitement par ICI (Johnson et al., 2016). Il semble donc que les effets cardiotoxiques soient principalement liés à une réponse immunitaire inappropriée à l'encontre du myocarde. De la nécrose a également été retrouvée dans le myocarde des patients décédés (Martin Huertas et al., 2019 ; Matson et al., 2018).

Le délai d'apparition de la myocardite est variable. Une analyse de Vigibase, la base de données de l'Organisation mondiale de la Santé sur les rapports de sécurité, a révélé que la myocardite était diagnostiquée 27 jours (intervalle de 5 à 155 jours) après le début de la thérapie aux ICI, et que 76% des cas sont survenus au cours des 6 premières semaines de traitement (Moslehi et al., 2018).

Les signes cardiaques de la cardiotoxicité aux ICI varient depuis un état asymptomatique jusqu'à la mort subite. Une augmentation des concentrations de troponine I/T dans le sérum était retrouvée chez 94% des patients atteints de myocardite mais étonnamment, près de 50% des patients ne présentaient aucun signe de dysfonctionnement systolique (Mahmood et al., 2018). De plus, les arythmies cardiaques sont courantes, notamment la fibrillation auriculaire, les arythmies ventriculaires, les anomalies de la conduction et la mort subite. Actuellement, il n'est pas possible d'identifier les patients susceptibles de développer des complications cardiaques avant le traitement aux ICI. Par conséquent, la cardio-oncologie se focalise sur la prévention, le dépistage et le traitement des maladies cardiovasculaires associés aux traitements anti-cancéreux sans compromettre leur efficacité, assurant ainsi plus de sécurité pour les patients (Cautela et al., 2016).

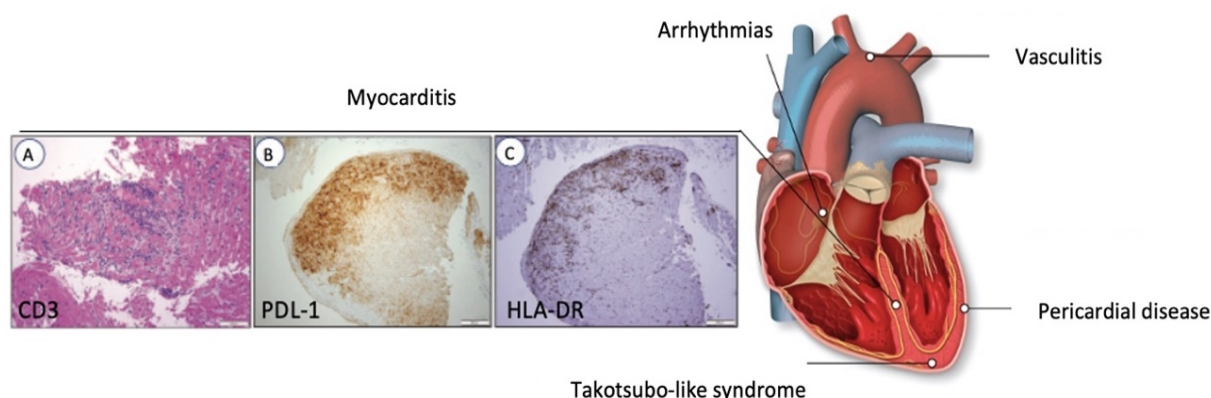


Figure 17 : Les cardiotoxicités associées aux ICI. Les complications cardiovasculaires associées au traitement par ICI peuvent être une myocardite, une vascularite, une péricardite, des troubles du rythme ou un syndrome de Takotsubo. La myocardite possède le plus fort taux de mortalité. **(A)** Biopsie endomyocardique montrant une infiltration de cellules immunitaires CD3⁺ dans le myocarde (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine). **(B-C)** Immunohistochimie montrant une coloration positive des myocytes pour PD-L1 et MHC de classe II, type HLA-DR dans les zones de myocardite lymphocytaire. Modifié après Grabie et al., 2019 ; Hu et al., 2019.

Également, la réponse immunitaire contre les cellules myocardiques pourrait être liée à la présence d'antigènes communs ou similaires à ceux de la tumeur. Certains clones spécifiques de cellules T dans les tumeurs ont été retrouvés dans les cœurs chez deux patients atteints de myocardites fatales après le traitement combiné des anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (Johnson et al., 2016). Ils ont observé des taux élevés d'antigènes spécifiques du muscle comme la desmine et la troponine dans les tumeurs de deux patients. Cependant, le lien entre les antigènes tumoraux et cardiaques reste inconnu. De plus, des cellules T activées spécifiques des antigènes tumoraux ont été retrouvées dans le sang des patients cancéreux et celles-ci pourraient migrer dans le myocarde même si elles ne présentent aucune spécificité pour une protéine cardiaque (Grabie et al., 2019).

3.4. Apport des modèles expérimentaux

Plusieurs études dans des modèles murins indiquent que les déficiences des voies CTLA-4, et PD-1/PD-L1 provoquent des complications cardiaques. Les souris CTLA-4^{-/-} (fonds BALB/c et C57BL/6) développent une myocardite sévère avec une infiltration massive de lymphocytes T (Tivol et al., 1995). Les souris PD-1^{-/-} présentent des dysfonctions cardiaques qui dépendent de leur fond génétique. Les souris sur fond BALB/c développent une cardiomyopathie dilatée avec une insuffisance cardiaque congestive (Nishimura et al., 2001). Des auto-anticorps spécifiques de la troponine I cardiaque (cTnI) ont été observés, liés à la cTnI à la surface des cardiomyocytes, provoquant l'augmentation du courant calcique de type L (Okazaki et al.,

2003). Le phénotype pouvait être reproduit en injectant un anticorps monoclonal anti-TnI. Enfin, il n'y avait aucune preuve d'inflammation du myocarde ou de lésion cardiaque liées aux lymphocytes T chez ces souris (Nishimura et al., 2001). Cependant, les souris sur fond MRL avec déficience PD-1 présentaient une myocardite avec infiltration massive de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Wang et al., 2010). Chez ces souris, des auto-anticorps contre la myosine cardiaque ont été retrouvés.

Chez les patients ayant déclaré une myocardite après traitement aux ICI, aucun auto-anticorps n'a été retrouvé. Chez les personnes saines, on trouve très peu de cellules T CD4⁺ spécifiques de l' α -myosin heavy chain (α -MyHC) dans le sang, ce qui indique un manque de tolérance des cellules T centrales à cette protéine (Gottumukkala et al., 2012). Chez les patients, le risque de développer une myocardite après un infarctus du myocarde est plus élevé quand ils présentent une proportion importante de cellules T productrices d'IFN- γ spécifiques de α -MyHC (Gottumukkala et al., 2012).

La déficience en PD-L1 chez les souris MRL induit une myocardite sévère (JA Luca et al., 2008). Dans un modèle de myocardite induite par transfection de cellules T CD8⁺, l'augmentation de l'expression de PD-L1 induite par l'IFN- γ sur l'endothélium cardiaque joue un rôle majeur dans la prévention de la myocardite létale (Grabie et al., 2007). Cette augmentation de PD-L1 a également été retrouvée dans le myocarde des patients décédés de cardiotoxicité après traitement aux ICI (Johnson et al., 2016). La sur-expression de PD-L1 dans le myocarde est probablement un mécanisme cardioprotecteur induit par les cytokines lors du blocage des points de contrôle immunitaire (**Figure 18**).

Une augmentation de la réponse inflammatoire a été observée après l'ajout d'anti-PD-1 dans un modèle cellulaire de cardiomyocytes dérivés des cellules souches embryonnaires en co-culture avec cellules T CD4⁺ (Tay et al., 2020). Chez la souris traitée par anti-PD-1, une dilatation du ventricule gauche avec infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était associée à une augmentation de l'expression de PD-L1, des protéines inflammatoires STAT1 phosphorylées, de NF- κ B phosphorylé, d'IFN- γ , et de TNF- α (Tay et al., 2020). Une autre étude chez la souris traitée par pembrolizumab (anti-PD-1) a montré une augmentation de la production de protéines inflammatoires comme IL-1 β , IL-8, IL-6, Leukotriène B4 et p65/NF- κ B dans le myocarde. L'association du trastuzumab, un anti-récepteur 2 de facteur de croissance épidermique humain (HER2), au pembrolizumab accroît encore l'inflammation et y associe de la fibrose myocardique (Quagliariello et al., 2019). La cardiotoxicité du traitement combiné trastuzumab et pembrolizumab est également rapportée dans un modèle cellulaire de

cardiomyocytes fœtaux co-cultivés avec les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Quagliariello et al., 2019). Par ailleurs, chez le singe traité par une combinaison d'anti-PD-1 et d'anti-CTLA-4, il a été retrouvé dans le myocarde une infiltration composée majoritairement de lymphocytes T, de macrophage et de cellules B (Ji et al., 2019). L'analyse transcriptomique révèle que la myocardite semblait associée à une augmentation de l'expression de plusieurs récepteurs de chimiokines comme CXCR3-CXCL9/CXCL10 et CCR5/CCL5, de molécules du MHC, STAT4, TNF, TNFSF8 (Ji et al., 2019). L'augmentation de l'expression des chimiokines CXCL9, CXCL11, et du récepteur CXCR3 a également été signalée dans le tissu cardiaque d'un patient décédé d'une myocardite après traitement par anti-CTLA-4 (Rueben et al., 2017).

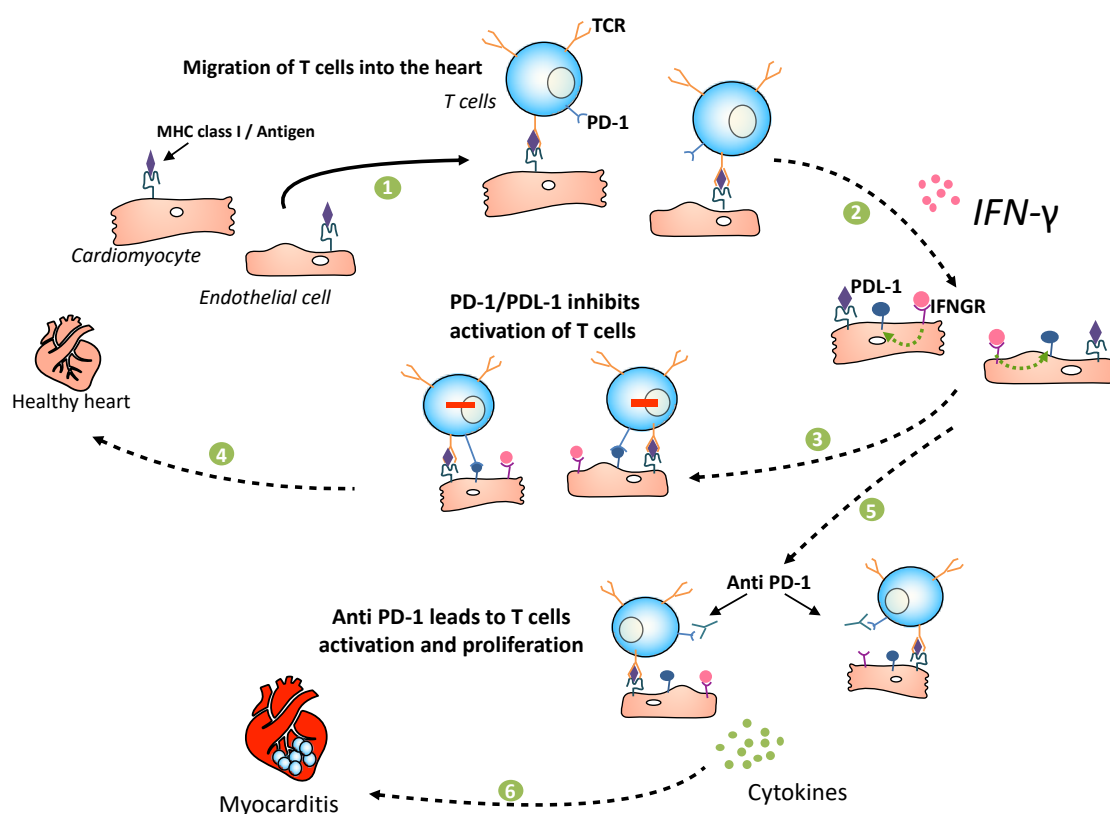


Figure 18 : Rôle protecteur de l'IFN-γ et de PD-L1 dans le cœur et effet toxique des ICIs. (1) Dans le cœur sain, 2 types de cellules cardiaques, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales, expriment le complexe du MHC classe I sur leurs membranes qui présentent des antigènes pour répondre à l'infiltration des cellules T lors d'une condition inflammatoire chronique (dans le cancer par exemple). **(2)** Une fois les cellules T activées, elles sécrètent l'IFN-γ. L'IFN-γ augmente l'expression de PD-L1 à la surface des cardiomyocytes et des cellules endothéliales. **(3)** PD-L1 se lie à PD-1, conduisant à l'inactivation des cellules T. **(4)** L'inflammation est limitée et le cœur reste sain. **(5)** En revanche, chez les patients cancéreux traités par anti-PD-1, la signalisation PD-1/PD-L1 est supprimée, entraînant la réactivation des cellules T contre les cellules tumorales. **(6)** L'infiltration des cellules T était observée dans le myocarde après le traitement par anti-PD-1. Adapté de Grabie et al., 2019.

Le traitement par anti-PD-1 seul n'induit pas d'apoptose dans les cardiomyocytes dérivés des cellules souches embryonnaires alors qu'on observe de l'apoptose dans les cardiomyocytes lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules T CD4⁺. Cet effet n'a pas été observé lorsque les cardiomyocytes ont été co-cultivés avec des cellules T CD8⁺ (Tay et al., 2020). La mort cellulaire a également été retrouvée dans les cardiomyocytes fœtaux traités par pembrolizumab (anti-PD-1), elle était potentialisée lors de la co-culture avec les PBMC (Quagliariello et al., 2019). Chez la souris traitée par nivolumab (anti-PD-1), Tay et al., 2020 ont observé une augmentation myocardique de protéine Caspase-3 et une diminution d'AKT phosphorylée.

3.5. La voie de l'IFN- γ

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans l'induction et la modulation des réponses immunitaires contre l'infection. C'est le seul membre de type II de la famille des interférons. L'IFN- γ est principalement sécrété par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ de type 1, les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ et les cellules NK, mais il peut également être produit par d'autres cellules, telles que les cellules B et les cellules APC professionnelles comme les monocytes/macrophages, et les cellules dendritiques (Schroder et al., 2004). La sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK et les APC professionnelles est importante dans la défense précoce contre l'infection, tandis que les lymphocytes T deviennent la principale source d'IFN- γ dans la réponse immunitaire adaptative (Frucht et al., 2001).

Le récepteur de l'IFN- γ (IFNGR) est exprimé dans la plupart des cellules nucléées. Le récepteur est composé de deux sous-unités, IFNGR1 et IFNGR2. IFNGR1 est responsable de la liaison au ligand, IFNGR2 augmente l'affinité d'IFNGR1 pour son ligand, améliore la stabilité du complexe et est obligatoire pour induire le signal de l'IFN- γ (Schroder et al., 2004). La voie de signalisation classique de l'IFN- γ est la voie JAK/STAT (**Figure 19**). Après la liaison au ligand, la signalisation de l'IFN- γ est initiée par l'auto-phosphorylation de JAK2, qui phosphoryle ensuite JAK1. JAK1 activé phosphoryle IFNGR1, fournissant un site d'amarrage pour STAT1 qui est également activé par phosphorylation par JAK2. STAT1 se dissocie ensuite du récepteur IFN- γ et pénètre dans le noyau pour se lier aux régions promotrices des gènes inducibles par l'IFN- γ (**Figure 19**). La voie des STAT est souvent accompagnée d'un rétrocontrôle négatif. Les modulateurs de la transduction du signal vers le noyau comprennent des molécules

inhibitrices, telles que les suppressors of cytokine signalling (SOCS). Les SOCS 1 et 3 se lient directement à JAK1/2 pour inhiber leur activité catalytique (Scott et al., 2002).

En plus de la signalisation médiée par STAT1, l'IFN- γ peut induire d'autres voies. Il a été démontré que MAPKs et ERK1/2 sont activées en réponse à l'IFN- γ . ERK1/2 médie l'activation de CAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP- β) et son activité transcriptionnelle de manière dépendante de STAT1 (Hu et al., 2001). PI3K est également activée en réponse à l'IFN- γ . PI3K active ensuite des cibles en aval telles que AKT et 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (Kaur et al., 2008). PI3K est responsable de la phosphorylation de STAT1-S727 et en partie de l'activité transcriptionnelle dépendante de STAT1. Ceci est médié par la protéine kinase C (Seo et al., 2009) qui est activée par PI3K. De plus, PI3K est nécessaire à la transcription de certains gènes induits par l'IFN- γ comme CXCL10 (Kaur et al., 2008).

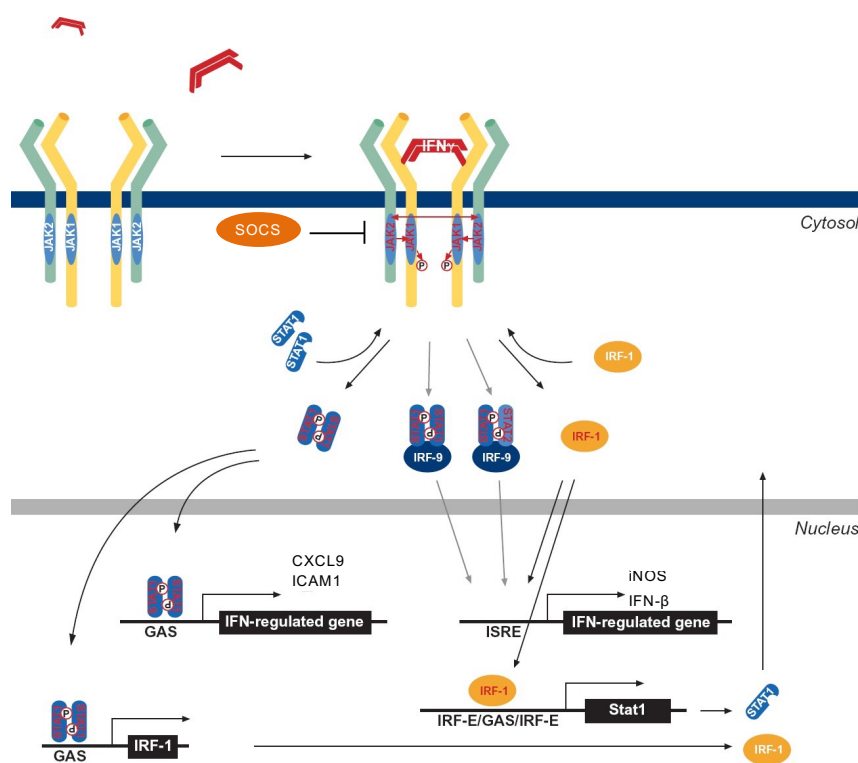


Figure 19 : La voie de l'IFN- γ dépendante de STAT1. Lors de la liaison de l'IFN- γ , JAK1 et 2 deviennent activés et phosphorylent IFNGR1. Cela induit la phosphorylation, la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT1. Une fois dans le noyau, les dimères STAT1 déclenchent la transcription de nombreux gènes régulés par l'IFN- γ . D'autres complexes comme Stat1:Stat1:IFN regulatory factor 9 (IRF-9) et facteur de transcription IRF-1 peuvent être activés par la signalisation et participer à la transcription des gènes régulés par l'IFN- γ . Plusieurs molécules sont responsables d'une inhibition de la signalisation comme les suppressors of cytokine signalling (SOCS). Modifié après Schroder et al., 2004.

L'implication de l'IFN- γ dans la myocardite associée aux ICI est très mal connue. L'expression de PD-L1 était augmentée dans le cœur des patients atteints de myocardite après traitement par ICI (Johnson et al., 2016). L'immunohistochimie pour HLA-DR, marqueur de substitution de l'activité de l'IFN- γ , montrait une coloration positive dans les zones du myocarde infiltrées par les lymphocytes T (Hu et al., 2019) ; la sur-expression de CXCL9 était induite majoritairement par l'IFN- γ dans le tissu cardiaque d'un patient ayant déclaré la myocardite après le traitement par ICI (Reuben et al., 2017). L'IFN- γ semble jouer un rôle important dans l'augmentation de PD-L1 pour protéger le cœur contre les lésions liées à la réponse immunitaire. La sur-expression de PD-L1 induite par l'IFN- γ a été observée *in vitro* dans différents modèles cellulaires, cardiomyocytes et cellules endothéliales. Cependant, il a été montré que PD-L1 n'était pas augmentée après la stimulation par LPS ou TNF- α dans les cellules endothéliales vasculaires de souris (EPPIHIMER et al., 2002).

La sur-expression des molécules du MHC est l'un des premiers effets biologiques induit par l'IFN- γ . Au cours de l'inflammation, l'IFN- γ augmente le MHC de classe I à la surface cellulaire pour faciliter la reconnaissance, la présentation d'antigène aux cellules T CD8⁺. Il augmente également le MHC de classe II afin de favoriser l'activation des cellules T CD4⁺ (Schroder et al., 2004). L'augmentation du MHC de classe I et du MHC de classe II est retrouvée à la fois dans les cellules APC professionnelles et non professionnelles. Il a été démontré que les myocytes fœtaux et adultes expriment faiblement le MHC de classe I et pas le MHC de classe II (Seko et al., 1990), alors que les cellules endothéliales microvasculaires expriment à la fois les antigènes du MHC de classe I et de classe II (Marelli-Berg et al., 2000). Ces deux molécules étaient fortement augmentées après la stimulation par l'IFN- γ des cellules stromales mésenchymateuses cardiaques fœtales humaines (Grinnemo et al., 2019), les cellules souches parthénogénétiques pluripotentes (Didié et al., 2017). Au contraire, le MHC de classe II n'était pas exprimé dans les cardiomyocytes adultes, comme dans la plupart des cellules APC non professionnelles, même après une stimulation pro-inflammatoire (Hufnagel and Maisch, 1991). Chez le singe traité par une combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4, la myocardite semblait associée à l'augmentation d'expression des CXCR3-CXCL9/CXCL10, CCR5/CCL5, et de molécules du MHC, qui sont induites par l'IFN- γ (Ji et al., 2019). Récemment, dans un modèle de souris traitées par anti-PD-1, les auteurs ont montré une augmentation de l'expression du gène et de la protéine de l'IFN- γ dans le cœur dilaté infiltré par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Tay et al., 2020).

L'impact de l'IFN- γ dans l'inflammation cardiaque a été étudié dans plusieurs modèles murins, et dans la plupart des cas, il a été montré que l'IFN- γ médie les effets anti-inflammatoires. Cela est vrai dans la myocardite induite par injection de cellules T CD8⁺ chez la souris (Grabie et al., 2007), dans les stades chroniques non infectieux de la myocardite induite par le virus Coxsackie (Fairweather et al., 2004), dans la myocardite auto-immune induite par la déficience en IFN- γ chez les souris (Eriksson et al., 2001), et lors du rejet d'allogreffe cardiaque (Nagano et al., 1997). L'augmentation de la fibrose cardiaque chez les souris déficientes en IFN- γ était associée à des zones d'inflammation accrue, à un épaissement péricardique et à une augmentation des taux de TGF- β 1, d'IL-1 β et d'IL-4 dans le cœur (Fairweather et al., 2004). A l'inverse, chez la souris, la sur-expression d'IFN- γ dans le foie induit une myocardite chronique avec dilatation ventriculaire gauche et altération de la fonction systolique, une infiltration du myocarde par des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, des macrophages et des cellules dendritiques. L'analyse moléculaire montrait une augmentation de l'expression des gènes comme le monocyte chemotactic protein 1 (MCP1), le C-C motif chemokine ligand 3 (CCL3), IL-12 et TNF, alors que les transcrits codant Caspase-3 et Caspase-7 n'étaient pas dérégulés (Reifenberg et al., 2007).

4. Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines induites en recherche médicale

Les modèles animaux et cellulaires ont grandement contribué à la recherche des mécanismes physiopathologiques des maladies même s'ils ne représentent pas pleinement les phénotypes des pathologies humaines. L'analyse de cellules humaines provenant de tissus malades est utile pour comprendre les mécanismes physiopathologiques, mais il est extrêmement difficile d'obtenir ces cellules dans un contexte clinique de routine, en particulier quand il s'agit du cœur. Au cours des dernières décennies, la recherche s'est tournée vers des stratégies basées sur les cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSC) obtenues à partir de cellules somatiques. Takahashi et Yamanaka ont montré la possibilité de reprogrammer, en sur-exprimant quatre facteurs de transcription : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc, des cellules somatiques adultes pour qu'elles acquièrent un état pluripotent (Takahashi and Yamanaka, 2006). Grâce à leur capacité d'auto-renouvellement infini, les hiPSC dérivées des patients, et donc portant le fond génétique du patient, pourraient fournir une source d'échantillons biologiques potentiellement illimitée, après différenciation en différents tissus. Par ailleurs, comme elles peuvent être obtenues à partir de cellules somatiques tels que les fibroblastes ou

les PBMC, leur utilisation permettrait de contourner les dilemmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches embryonnaires.

La génération des hiPSC à partir de patients porteurs de pathologies spécifiques et la possibilité de différencier ces hiPSC en différents types cellulaires a ouvert de nombreuses voies d'explorations. L'utilisation de ces cellules va de la modélisation *in vitro* des maladies, aux tests pharmacologiques et à la thérapie cellulaire (**Figure 20**). À ce jour, l'utilisation des hiPSC pour la modélisation des maladies a été rapportée pour les maladies neurologiques dégénératives, les troubles musculaires, les maladies métaboliques et les maladies cardiaques (Tanaka et al., 2015). La modélisation d'une maladie apporte de nouvelles connaissances sur les mécanismes physiopathologiques, ce qui peut conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, y compris dans le champ innovant de la médecine personnalisée. Ainsi, la variabilité de la réponse liée à l'âge, au sexe, aux thérapies antérieures, à la prédisposition génétique de chaque patient pourrait être prise en compte (Sayed et al., 2019). Les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) visent à identifier les polymorphismes nucléotidiques simples communs ou d'autres variants génétiques associés à des maladies complexes, fournissant un outil puissant pour étudier l'impact de la variation génétique sur la réponse médicamenteuse individuelle. Dans ce cadre, les hiPSC qui conservent la variance génétique présente chez les patients, pourraient être un modèle idéal pour valider les études GWAS (Warren et al., 2017). Par ailleurs, l'utilisation des hiPSC en thérapie cellulaire a déjà été utilisée dans la transplantation de cellules épithéliales pigmentaires rétinienne, de cellules neuronales et de cardiomyocytes. Ces travaux sont actuellement en cours dans des modèles animaux et chez l'homme (Tanaka et al., 2015).

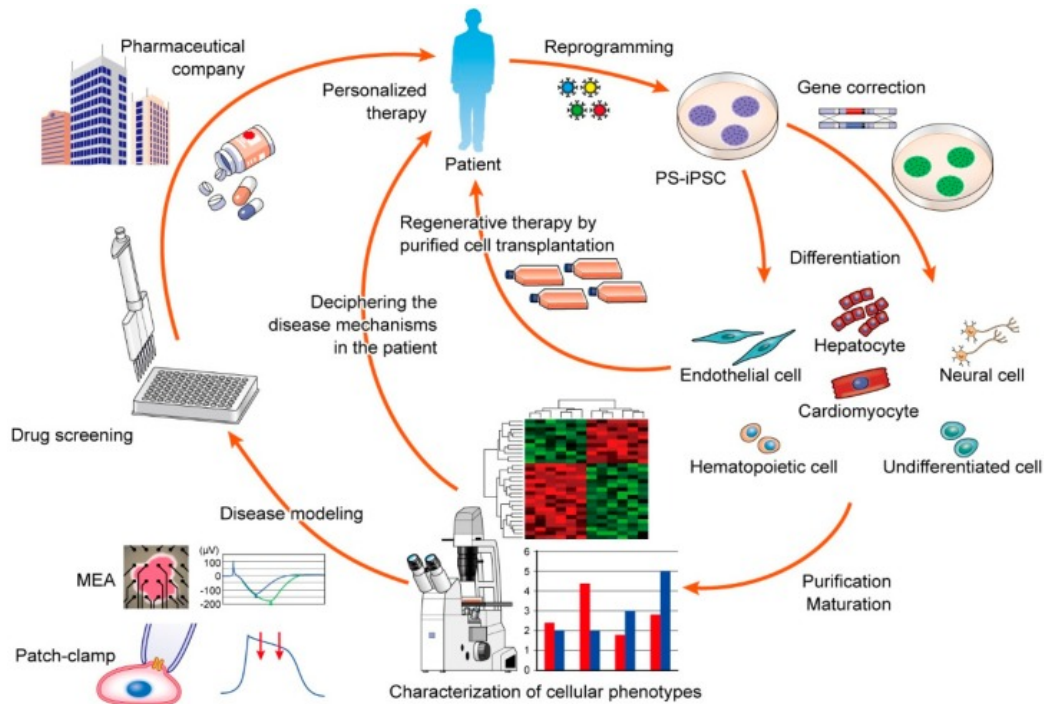


Figure 20 : Applications potentielles des hiPSC spécifiques de patient. Les cellules somatiques dérivées de patients sont reprogrammées en hiPSC, *via* l'induction de facteurs de transcription définis, puis différenciées en différents types spécifiques. Les cellules purifiées et expansées sont potentiellement utilisées dans les transplantations cellulaires. Elles peuvent être appliquées à des analyses *in vitro* telles que la modélisation de maladies et les tests de médicaments. Dans la modélisation des maladies, les phénotypes cellulaires sont utilisés par diverses méthodes expérimentales pour comprendre les mécanismes de la maladie, ce qui peut conduire au développement de stratégies thérapeutiques. À l'avenir, les systèmes hiPSC spécifiques des patients pourraient être une plate-forme utile pour la médecine personnalisée et la découverte efficace des médicaments en collaboration avec l'industrie pharmaceutique. MEA, réseau multi-électrodes. D'après Tanaka et al., 2015.

4.1. Modélisation des maladies cardiaques héréditaires dans les hiPSC

Les premières maladies décrites en utilisant les cardiomyocytes dérivés des hiPSC (hiPSC-CM) étaient liées à des anomalies des canaux ioniques cardiaques, comme le syndrome de QT long et les tachycardies ventriculaires catécholaminergiques. Moretti et al., 2010 ont utilisé les hiPSC-CM dérivées de deux patients porteurs du syndrome de QT long de type 1 lié à la mutation R190Q dans le potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 (KCNQ1) pour reproduire la maladie *in vitro*. Le phénotype caractéristique de la maladie, notamment le potentiel d'action prolongé dans les sous-types ventriculaires et auriculaires était conservé. De plus, les cellules dérivées des patients montraient également des arythmies spontanées, plus prononcées après traitement par l'isoprotérénol, un agoniste adrénergique (Moretti et al, 2011).

Fatima et al., 2011 ont modélisé les tachycardies ventriculaire catécholergiques en utilisant des hiPSC-CM dérivées d'un patient avec une mutation ponctuelle de RYR2 provoquant des arythmies et des post-dépolarisations retardées. En plus des canalopathies, plusieurs équipes ont cherché à modéliser d'autres cardiomyopathies héréditaires rares en utilisant des hiPSC-CM comme la génération de cardiomyocytes de patients atteints de « LEOPARD », un syndrome complexe qui comprend des anomalies de conduction et une cardiomyopathie hypertrophique. Dans ces cellules, le facteur de croissance des fibroblastes 2 (bFGF) n'était pas capable d'activer MAPK, entraînant une altération de la signalisation RAS-MAPK qui à son tour conduisait à un phénotype de cardiomyopathie hypertrophique (Carvajal-Vergara et al., 2010). Dans une autre étude utilisant des hiPSC-CM d'un patient atteint de cardiomyopathie dilatée hébergeant une mutation de TNNT2, les auteurs ont montré qu'une régulation épigénétique altérée des principaux gènes de la signalisation β -adrénergique dans les cardiomyocytes mutants était la cause de défauts de contraction.

4.2. Apport des hiPSC dans l'étude des cardiotoxicités induites par les traitements anticancéreux

Il a été démontré que les hiPSC-CM récapitulent les effets indésirables cardiaques spécifiques de patients en réponse à la chimiothérapie. Burridge et al., 2016 ont récupéré des fibroblastes de patients traités à la doxorubicine (DOX) qui ont développé ou non une cardiotoxicité induite par la DOX et les ont reprogrammés en hiPSC. Ils ont ensuite différencié en hiPSC-CM et caractérisé la viabilité cellulaire, la fonction mitochondriale et métabolique, la régulation de la signalisation calcique, l'activité de la voie antioxydante et la production de ROS, après exposition à la DOX. Pour chacun de ces mécanismes, ils ont observé que les hiPSC-CM de patients ayant développé une cardiotoxicité étaient plus sensibles à la DOX que celles de patients n'ayant pas déclaré de cardiotoxicité. De plus, ils ont identifié des gènes différenciellement exprimés avant et après le traitement par la DOX entre les hiPSC-CM provenant de ces deux groupes de patient.

Le modèle de cardiotoxicité des hiPSC-CM a également été utilisé pour caractériser d'autres anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab. Le dysfonctionnement mitochondrial et l'altération de la voie du métabolisme énergétique cardiaque sont les principales causes du phénotype cardiotoxique induit par le trastuzumab (Kitani et al., 2019). En plus d'un métabolisme altéré, ces auteurs ont identifié une contractilité et une autophagie plus altérées dans les cardiomyocytes des patients présentant une cardiotoxicité sévère.

Plusieurs autres études ont utilisé des hiPSC non spécifiques pour examiner les mécanismes de la cardiotoxicité de différentes chimiothérapies. Sharma et al., 2017 ont différencié en cardiomyocytes, cellules endothéliales et fibroblastes cardiaques des hiPSC provenant de 11 volontaires sains et de 2 patients traités par des inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKIs) n'ayant pas développé de cardiotoxicité connue afin d'examiner le potentiel à induire une cardiotoxicité de 21 TKIs. Dans les hiPSC-CM, les auteurs ont caractérisé la cytotoxicité, la contractilité, l'électrophysiologie, la signalisation du calcium et celle du récepteur tyrosine kinase en réponse à l'exposition aux TKIs et ont utilisé la cytotoxicité et la contractilité pour développer un « indice de sécurité cardiaque » en corrélation avec les phénotypes cliniques. Ils ont également examiné la cytotoxicité des TKIs dans les cellules endothéliales et les fibroblastes cardiaques. Enfin, ils ont étudié l'expression différentielle des gènes avant et après l'exposition aux TKIs dans les hiPSC-CM. Cette étude a illustré le potentiel des cellules dérivées des hiPSC en tant que « plateforme à haut débit » pour dépister le potentiel de médicaments spécifiques à induire des événements indésirables cardiovasculaires.

Une augmentation de la réponse inflammatoire a été observée après traitement par anti-PD-1 d'un modèle cellulaire de cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires en co-culture avec des cellules T CD4⁺. De plus, le traitement par anti-PD-1 seul n'induit pas d'apoptose dans les cardiomyocytes dérivés des cellules souches embryonnaires. Cependant, le nivolumab pourrait induire l'apoptose dans les cardiomyocytes lorsqu'ils ont été co-cultivés avec des lymphocytes T CD4⁺. Cet effet n'a pas été observé lorsque les cardiomyocytes ont été co-cultivés avec des lymphocytes T CD8⁺. Ce résultat ne concerne qu'une seule étude utilisant les cardiomyocytes dérivés des cellules souches non spécifiques de patients traités par ICIs (Tay et al., 2020).

4.3. Limites actuelles des hiPSC

Les hiPSC-CM ont été générés avec succès pour modéliser les maladies *in vitro* ; cependant, il reste encore des obstacles méthodologiques et expérimentaux à surmonter. Le problème le plus important est que les hiPSC-CM montrent des phénotypes immatures, différents des cardiomyocytes adultes *in vivo*. Afin de convertir les hiPSC-CM en cellules matures, diverses techniques ont été employées, telles que la culture longue, l'augmentation de la rigidité du substrat, la stimulation électrique ou les manipulations métaboliques (Tanaka et al., 2015). De plus, la pureté des cultures de cellules différenciées est également d'une grande importance. La culture d'hiPSC différenciées est hétérogène et contient de nombreux types de cellules, y compris celles qui sont encore non différenciées. De plus, il existe au moins trois sous-types de

cardiomyocytes (ventriculaires, auriculaires et nodaux), qui peuvent être distingués en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques et de l'expression génique. On s'attend donc à ce que des populations hétérogènes de cardiomyocytes induisent une variabilité au cours des expériences. D'autres groupes ont également essayé de différencier les hiPSC en sous-types spécifiques en régulant les voies moléculaires par des milieux définis. Enfin, des méthodes de purification des cardiomyocytes utilisant des voies métaboliques spécifiques et des marqueurs spécifiques ont également été rapportées.

Le tissu cardiaque est composé de populations cellulaires hautement organisées, telles que les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes, et des composants de la matrice extracellulaire. Étant donné que les maladies cardiovasculaires peuvent résulter du dysfonctionnement de cellules qui ne sont pas toujours des cardiomyocytes, et souvent de dysfonctionnements multicellulaires, les analyses spécifiques des cardiomyocytes ne peuvent pas modéliser toutes les maladies cardiaques. Pour cette raison, il serait préférable de modéliser les maladies cardiovasculaires à l'aide d'une combinaison de divers types de cellules, notamment des cardiomyocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et également des cellules immunitaires, qui peuvent toutes être différenciées à partir des hiPSC.

Études de la cardiomyopathie septique

Cette partie du travail a été réalisée avec les équipes du Pr Marc Leone (PU-PH, Responsable du Service anesthésie-réanimation, Hôpital Nord, Marseille) et de Monique Bernard (Directrice du CRMBM, Marseille).

Le sepsis représente une des principales causes d'admission en réanimation dans le monde avec une morbi-mortalité élevée. Chez les patients en choc septique, on observe une défaillance d'organes dont une dysfonction cardiaque chez environ 60% des patients (Vieillard-Baron et al., 2008). Le blocage des récepteurs β 1-adrénergiques semble être une nouvelle approche thérapeutique prometteuse pour la prévention et le traitement de la dysfonction myocardique liée au sepsis.

L'objectif général des trois études présentées était d'étudier l'influence des hormones sexuelles femelles sur la régulation de la dysfonction cardiaque par la voie β 1-adrénergique au cours du sepsis.

1. Étude 1

1.1. Contexte de l'étude 1

La majorité des études chez l'animal portant sur la dysfonction cardiaque liée au sepsis a été effectuée chez les mâles et il n'existait pas, au moment de nos travaux, d'étude comparant la réponse entre mâle et femelle à un blocage de la voie β -adrénergique pendant le sepsis. Le but de notre première étude était d'évaluer l'intérêt d'un β 1-bloquant sélectif, le landiolol, dans la prévention de la dysfonction myocardique liée au sepsis en fonction du sexe. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de rat adulte, soumis à une ligature et ponction caecale (CLP). Dans cette étude, la fonction cardiaque a été évaluée par cinéIRM par nos collaborateurs et je me suis particulièrement intéressée à l'analyse de l'expression des gènes et des protéines afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés aux différences phénotypiques observées entre mâles et femelles.

1.2. Article 1

Cette étude a fait l'objet d'une publication, dans laquelle je suis co-auteure, dans *Critical Care Medicine*, DOI : 10.1097/CCM.0000000000003146.

Sex-Mediated Response to the Beta-Blocker Landiolol in Sepsis: An Experimental, Randomized Study

Calypso Mathieu, MD^{1,2}; Martine Desrois, PhD²; Frank Kober, PhD²; Nathalie Lalevée, PhD³; Carole Lan, MSc²; Natacha Fourny, MSc²; Magali Iché-Torres, MSc³; Thi Thom Tran, MSc³; Linh Thuy Lê, MSc³; Mervyn Singer, MD, FRCP⁴; Jean-Louis Mège, MD, PhD⁵; Monique Bernard, PhD²; Marc Leone, MD, PhD^{1,5}

Objectives: To investigate any gender effect of the beta-1 adrenergic blocker, landiolol, on cardiac performance and energy metabolism in septic rats, and to explore the expression of genes and proteins involved in this process.

Design: Randomized animal study.

Setting: University research laboratory.

Subjects: Male and female Wistar rats.

Interventions: One hour after cecal ligation and puncture, male and female rats were randomly allocated to the following groups: sham male, cecal ligation and puncture male, cecal ligation and puncture + landiolol male, sham female, cecal ligation and puncture female, and cecal ligation and puncture + landiolol female. Cardiac MRI was carried out 18 hours after cecal ligation and puncture to assess in vivo cardiac function. Ex vivo cardiac function mea-

surement and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy were subsequently performed using an isovolumic isolated heart preparation. Finally, we assessed cardiac gene and protein expression.

Measurements and Main Results: In males, landiolol increased indexed stroke volume by reversing the indexed end-diastolic volume reduction without affecting left ventricle ejection fraction. In females, landiolol did not increase indexed stroke volume and indexed end-diastolic volume but decreased left ventricle ejection fraction. Landiolol had no effect on ex vivo cardiac function and on high-energy phosphate compounds. The effect of landiolol on the gene expression of natriuretic peptide receptor 3 and on protein expression of phosphorylated-AKT:AKT ratio and endothelial nitric oxide synthase was different in males and females.

Conclusions: Landiolol improved the in vivo cardiac performance of septic male rats while deleterious effects were reported in females. Expression of natriuretic peptide receptor 3, phosphorylated-AKT:AKT, and endothelial nitric oxide synthase are signaling pathways to investigate to better understand the sex differences in sepsis. (*Crit Care Med* 2018; 46:e684–e691)

Key Words: adrenergic beta-blockers; cardiac function; energy metabolism; magnetic resonance imaging; sepsis; sex differences

¹Aix Marseille University, Service d'anesthésie et de réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.

²Aix-Marseille University, CNRS, CRMBM, Marseille, France.

³Aix-Marseille University, INSERM, TAGC, UMR 1090, Marseille, France.

⁴University College London, 4919, Bloomsbury Institute of Intensive Care Medicine, London, United Kingdom.

⁵Aix-Marseille University, CNRS UMR 7278, IRD198, INSERM U1095, Institut Hospitalier Universitaire Méditerranée-Infection, Marseille, France.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

Supported, in part, by Fondation pour la Recherche Médicale (DEA 20150633224), AOP Orphan, Lions Club Marseille Doyen and France Life Imaging (grant ANR-11-INBS-0006).

Dr. Mathieu received funding from Fondation Recherche Médicale (DEA20150633224) and Lions club Marseille Doyen. Dr. Singer received funding from AOP Pharma. Dr. Mege disclosed government work. Dr. Leone's institution received funding from AOP Orphan (provided treatment: landiolol). The remaining authors do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, Email: marc.leone@ap-hm.fr

Copyright © 2018 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000003146

The adrenergic system plays a key role in septic shock (1). However, prolonged and excessive adrenergic stimulation is cardiotoxic (2). In critically ill patients, the administration of dobutamine to maintain an elevated cardiac index (CI) is associated with increased mortality (3). In a previous animal study, we showed that use of a pure β -agonist led to hypertrophic cardiac failure (4). In experimental models of sepsis esmolol, a selective β_1 -adrenergic blocker improved cardiac contractility, stroke volume (SV), and vascular responsiveness to norepinephrine (5–7). In patients in established septic shock, Morelli et al (8) also showed that esmolol infusion reduced heart rate (HR), increased SV, and decreased norepinephrine requirements.

Experimentally, the host response to an inflammatory insult differs according to sex (9, 10). We showed that male mice were at higher risk of developing severe forms of acute Q fever (11, 12). In an endotoxin murine model, ex vivo cardiac performance was more impaired (10). In humans, sex seems to affect the response to β -blockers (13, 14).

To our knowledge, in sepsis, the gender-dependent response to β -blockers remains undetermined. Our hypothesis was that beta-blockade would prevent cardiac dysfunction in males but not in females. Landiolol has a high affinity for β_1 -adrenergic receptors (β_1 -AR), with a β_1 : β_2 ratio of 255, compared with 33 for esmolol (15).

We thus assessed the sex-dependent effects of landiolol on in vivo cardiac performance during sepsis using MRI. We further evaluated the effects of landiolol on ex vivo cardiac performance, energy metabolism, and oxidative stress on an isolated perfused heart preparation. Finally, we investigated the expression of candidate genes involved in various pathways and known to be involved in cardiac function to elicit potential mechanisms of action during sepsis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Cecal Ligation and Puncture Model

Male and female Wistar rats (9–12 wk old, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) were housed for a 5–7-day acclimatization period in a temperature- and light-controlled room with free access to water and food. All animal procedures were conducted in accordance with national Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals in conformity with the 2010/63 European Union directive and with the approval of the Institutional Animal Care Committee of Aix-Marseille University (APAFIS number 3746-201601221813985). The anesthetic and surgical procedure is reported in the **supplemental data** (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

Experimental Protocol

Supplemental Figure 1 (Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/CCM/D504>; **legend**, Supplemental Digital Content 5, <http://links.lww.com/CCM/D507>) summarizes experimental protocol. One hour after cecal ligation and puncture (CLP), males and females were randomized to receive landiolol (AOP Orphan, Vienna, Austria) diluted in n-saline and infused at 0.1 mg/kg/min or n-saline (10 mL/kg/hr). The infusion volume was similar in all groups. Six groups were studied: sham male ($n = 6$), CLP male ($n = 8$), CLP + landiolol male ($n = 7$), sham female ($n = 7$), CLP female ($n = 8$), and CLP + landiolol female ($n = 7$). Eighteen hours after surgery, rats were anesthetized using 1.5–2% isoflurane. The caudal ventral artery was cannulated (24-gauge catheter) for blood pressure recording (TruWave pressure transducer; Edwards Lifesciences, Irvine, CA). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure (DBP), and mean blood pressure (MBP) were recorded at H18. Body weight variations between H0 and H18 were measured. Cardiac MRI was performed 18 hours after CLP to assess in vivo cardiac function (cine-MRI) and myocardial perfusion

(arterial spin labeling [ASL] MRI). Ex vivo cardiac function measurement and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy (MRS) were performed at H19 using isolated heart preparation. At H20, hearts were frozen for subsequent biochemical analyses and quantification of gene expression.

MRI Assessment of In Vivo Cardiac Function

MRI was performed 18 hours after CLP, immediately after arterial cannulation. During MRI, inhalation anesthesia was maintained with 1.4–1.8% isoflurane in 1.5 L/min oxygen continuously delivered through a face mask. Details are provided in the supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

End-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV), SV, left ventricle ejection fraction (LVEF), mean wall thicknesses in diastole and systole, and systolic wall thickening (sWTn) were calculated from the volume measurements, as described previously (16). Cardiac output (CO) was calculated as $\text{CO} = \text{HR} \times \text{SV}$. EDV (indexed EDV [EDVi]), ESV (indexed ESV [ESVi]), SV (indexed SV [SVi]), and CI were indexed to weight.

In vivo myocardial perfusion was quantified using the cine-ASL technique, as previously described (17). Image analyses were performed using a home-made program running in an IDL environment (Interactive Data Language, ITT Visual Solutions, Boulder, CO) which generated absolute myocardial blood flow (MBF) maps. MBF was determined by manually delineating regions of interest in the entire left ventricular myocardium on the corresponding MBF maps.

Isolated Rat Heart Preparation for Ex Vivo Cardiac Function and ^{31}P MRS

At H19, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 50 mg/kg pentobarbital sodium. Blood samples were taken through the arterial catheter and immediately centrifuged. After bilateral thoracotomy, the heart was quickly excised and mounted onto an isolated perfused heart apparatus according to the Langendorff method (4). Details are provided in the supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

A latex balloon was introduced into the left ventricle to evaluate ex vivo cardiac function. End-diastolic pressure was set to 10 mm Hg. Left ventricular developed pressure (LVDP) and HR were monitored (18). The rate pressure product (RPP), calculated as the product of LVDP and HR, was used as an index of cardiac function. Coronary flow was measured by timed collection of the coronary venous effluent and indexed by weight of heart.

The perfused rat heart was placed in a 20-mm magnetic resonance sample tube and inserted into a ^{31}P probe seated in the bore of a superconducting wide-bore (89 mm) 4.7-T magnet (Oxford Instruments, Oxford, United Kingdom) interfaced with a Bruker-Nicolet WP-200 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). The appropriate conditions for acquiring ^{31}P magnetic resonance spectra and the quantification of phosphorus metabolites have been detailed previously (4, 18). Details are provided in the supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Immunoblotting and Western-Blot, and Biochemical Analyses in Plasma

For more details, see the supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM. After statistical evaluation, the number of rats required was six per group to show a 30% increase in SV by landiolol with a power and an alpha risk of 80% and 5%, respectively. Significant differences between groups were determined using two-way analysis of variance followed by Sidak post hoc testing with Graphpad Prism software (Graphpad Prism 7.0, La Jolla, CA). A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Isolated heart preparation data from six rats (CLP male [*n* = 2], sham female [*n* = 2], CLP female [*n* = 2]) were not determined due to traumatic removal.

RESULTS

Effects of CLP and Landiolol on Weight Variation and Temperature After 18 Hours

In both males and females, CLP was associated with weight gain (*p* < 0.001 for both) and hypothermia (*p* < 0.001 and *p* = 0.003, respectively), compared with sham animals (Table 1). The CLP + landiolol male group had a lower weight gain (*p* = 0.001) and less hypothermia (*p* = 0.015) than untreated CLP males. In septic females, landiolol did not impact upon either weight or temperature.

Effects of CLP and Landiolol on Hemodynamic Variables After 18 Hours

Landiolol decreased HR from 404 ± 9 to 330 ± 11 beats/min in septic males (*p* < 0.001) and from 388 ± 14 to 345 ± 14 beats/min in septic females (*p* = 0.024) (Table 1). Landiolol did not affect blood pressure in males, whereas DBP and MBP decreased in landiolol-treated females (*p* = 0.002; *p* = 0.013). Plasma lactate concentrations were similar in all groups.

Effects of CLP and Landiolol on In Vivo Cardiac Function and Perfusion Using MRI

Cardiac MRI variables are reported in Table 2 and indexed variables in Figure 1. In males, SVi, CI, and EDVi decreased after CLP (*p* < 0.001 vs sham), whereas only CI and EDVi decreased in females (*p* = 0.020 and *p* = 0.046 vs sham).

In septic males, landiolol administration increased SVi, ESVi, and EDVi (all *p* < 0.05) compared with untreated animals (Fig. 1). LVEF and systolic wall thickening (sWtn) were similar between groups (Table 2). In females, landiolol increased ESVi (*p* < 0.001) and decreased LVEF (*p* < 0.001) and sWtn (*p* = 0.009) compared with untreated animals. MBF was not different between groups.

Effects of CLP and Landiolol on Ex Vivo Cardiac Function in the Isolated Heart Preparation

Table 3 shows myocardial function and coronary flow in the isolated rat heart preparation at H19. Heart weight to body weight ratios were similar between groups. CLP decreased LVDP and RPP in both males and females (all *p* < 0.05). LVDP, RPP, and coronary flow index were similar between landiolol-treated and untreated CLP groups.

TABLE 1. Effects of Cecal Ligation and Puncture and Landiolol on Physiologic and Hemodynamic Variables After 18 Hours

Variables	Males			Females		
	Sham (<i>n</i> = 6), Mean $\pm$ SEM	CLP (<i>n</i> = 8), Mean $\pm$ SEM	CLP + Landiolol (<i>n</i> = 7), Mean $\pm$ SEM	Sham (<i>n</i> = 7), Mean $\pm$ SEM	CLP (<i>n</i> = 8), Mean $\pm$ SEM	CLP + Landiolol (<i>n</i> = 7), Mean $\pm$ SEM
Initial weight (g)	324 $\pm$ 21	304 $\pm$ 13	327 $\pm$ 13	227 $\pm$ 10 ^c	225 $\pm$ 6 ^c	212 $\pm$ 7 ^c
Weight variation (%)	-0.9 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.3 ^a	2.4 $\pm$ 0.6 ^b	-2.4 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 1.2 ^a	4.1 $\pm$ 1 ^a
Temperature (°C)	36.3 $\pm$ 0.3	34.8 $\pm$ 0.3 ^a	35.8 $\pm$ 0.2 ^b	36.4 $\pm$ 0.1	35.3 $\pm$ 0.2 ^a	35.5 $\pm$ 0.2 ^a
Heart rate (beats/min)	400 $\pm$ 7	404 $\pm$ 9	330 $\pm$ 11 ^{a,b}	414 $\pm$ 8	388 $\pm$ 14	345 $\pm$ 14 ^{a,b}
Systolic blood pressure (mm Hg)	137 $\pm$ 5	122 $\pm$ 8	113 $\pm$ 7	148 $\pm$ 10	145 $\pm$ 9	121 $\pm$ 4 ^a
Diastolic blood pressure (mm Hg)	97 $\pm$ 3	89 $\pm$ 7	81 $\pm$ 4	107 $\pm$ 7	105 $\pm$ 6	79 $\pm$ 3 ^{a,b}
Mean blood pressure (mm Hg)	115 $\pm$ 3	103 $\pm$ 7	97 $\pm$ 6	125 $\pm$ 8	123 $\pm$ 7	98 $\pm$ 3 ^{a,b}
Lactatemia (mmol/L)	4.1 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.4

CLP = cecal ligation and puncture.

^a*p* < 0.05 vs sham male and vs sham female, respectively.

^b*p* < 0.05 vs CLP male and vs CLP female, respectively.

^c*p* < 0.05 vs male of the equivalent group.

Weight variation means weight difference percentage between H0 and H18.

TABLE 2. In Vivo Cardiac Function Using MRI After 18 Hours

Variables	Males			Females		
	Sham (n = 6), Mean ± SEM	CLP (n = 8), Mean ± SEM	CLP + Landiolol (n = 7), Mean ± SEM	Sham (n = 7), Mean ± SEM	CLP (n = 8) Mean ± SEM	CLP + Landiolol (n = 7) Mean ± SEM
Stroke volume (μL)	331 ± 7	191 ± 16 ^a	272 ± 11 ^{ab}	215 ± 10 ^c	182 ± 15	167 ± 15 ^c
Cardiac output (mL/min)	132 ± 3	77 ± 7 ^a	89 ± 3 ^a	89 ± 5 ^c	70 ± 6 ^a	57 ± 5 ^{a,c}
End-diastolic volume (μL)	442 ± 18	276 ± 18 ^a	434 ± 18 ^b	300 ± 16 ^c	238 ± 22	276 ± 20 ^c
End-systolic volume (μL)	112 ± 13	85 ± 10	162 ± 11 ^{ab}	84 ± 10	56 ± 9	109 ± 8 ^{b,c}
Left ventricular ejection fraction (%)	75 ± 2	69 ± 4	63 ± 2 ^a	72 ± 2	77 ± 2	60 ± 2 ^{ab}
Mean wall thickness in diastole (mm)	1.55 ± 0.04	1.83 ± 0.09 ^a	1.54 ± 0.05 ^b	1.39 ± 0.02	1.60 ± 0.06 ^c	1.49 ± 0.09
Mean wall thickness in systole (mm)	2.67 ± 0.08	2.82 ± 0.11	2.29 ± 0.06 ^{ab}	2.46 ± 0.1	2.71 ± 0.1	2.14 ± 0.06 ^b
Systolic wall thickening (%)	73 ± 5	55 ± 5	50 ± 5 ^a	76 ± 5	69 ± 4	46 ± 7 ^{ab}
Myocardial blood flow (mL/g/min)	7.40 ± 0.92	7.87 ± 0.84	8.20 ± 0.52	7.00 ± 0.85	6.91 ± 0.64	7.02 ± 1.01

CLP = cecal ligation and puncture.

^a*p* < 0.05 vs sham male and vs sham female, respectively.

^b*p* < 0.05 vs CLP male and vs CLP female, respectively.

^c*p* < 0.05 vs male of the equivalent group.

³¹P MRS Measurements of Myocardial Energy Metabolism and Intracellular pH

High-energy phosphate compounds and intracellular pH (pHi) measured by ³¹P MRS are shown in **Supplemental Table 1** (Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/CCM/D505>). Data represent the average of the four last spectra. Phosphocreatine, adenosine triphosphate (ATP), phosphomonoesters, inorganic phosphate, pHi, and phosphocreatine/ATP ratio were similar in males and females.

Effects of CLP and Landiolol on Myocardial Gene Expression

Genes encoding signaling proteins known for their role in cardiac and immune functions are detailed in **Supplemental Table 2** (Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/CCM/D506>). Interleukin (IL)-10 increased in males and females after CLP (*p* < 0.001 and *p* < 0.01, respectively), without any effect of landiolol. IL-15 was lower in CLP females (*p* = 0.01 vs sham), and landiolol reversed this effect (*p* = 0.032 vs CLP female group). IL-1 receptor antagonist was higher in the CLP female group compared with sham (*p* = 0.016), and landiolol attenuated this effect. These variations were not found in males. More details are available in the supplemental data (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/D503>).

CLP decreased natriuretic peptide receptor (NPR) 3 transcript levels in both males and females (*p* < 0.001). Landiolol reversed this decrease in males (*p* > 0.05 vs sham males) but not in females (*p* = 0.002 vs sham females). In males, no effect of CLP was observed on transcript levels of ryanodine receptor (RyR) 2. In females, RyR2 expression was decreased after CLP with landiolol reversing this effect.

Effects of CLP and Landiolol on Myocardial Protein Expression

In CLP males, the phosphorylated-AKT (pAKT):AKT ratio decreased (*p* = 0.04 vs sham males) (**Fig. 2**), and this was unaffected by landiolol. In CLP females, the pAKT:AKT ratio was similar to sham, and landiolol increased this ratio (*p* = 0.004 vs CLP females) (**Fig. 2**). In males, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression was higher in CLP than in sham (*p* = 0.004). Landiolol attenuated this effect (**Fig. 2**). In females, CLP and landiolol did not affect eNOS expression, compared with sham females. Compared with males, eNOS expression was higher in sham (*p* = 0.028) and landiolol females (*p* = 0.026).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first comparison of response to β-blockers in males and females with sepsis-induced myocardial dysfunction. Our results highlight disparities between the sexes. Although landiolol improved cardiac performance in the septic males, it was associated with a reduction in LVEF and sWtn in the septic females. A strength of our study relies on the assessment of cardiac function using MRI, providing an in vivo assessment of cardiac function in addition to ex vivo evaluation. At variance with previous models based on the isolated perfused heart (7, 19, 20), the in vivo study incorporates heart vessel interactions in the analysis of cardiac performance. As in septic patients, β-blockers were associated with reduced ventriculo-arterial decoupling (21, 22), underlining the clinical relevance of the model.

In males, landiolol improved SVi, probably by reversing the reduction in EDVi after CLP but without any significant effect

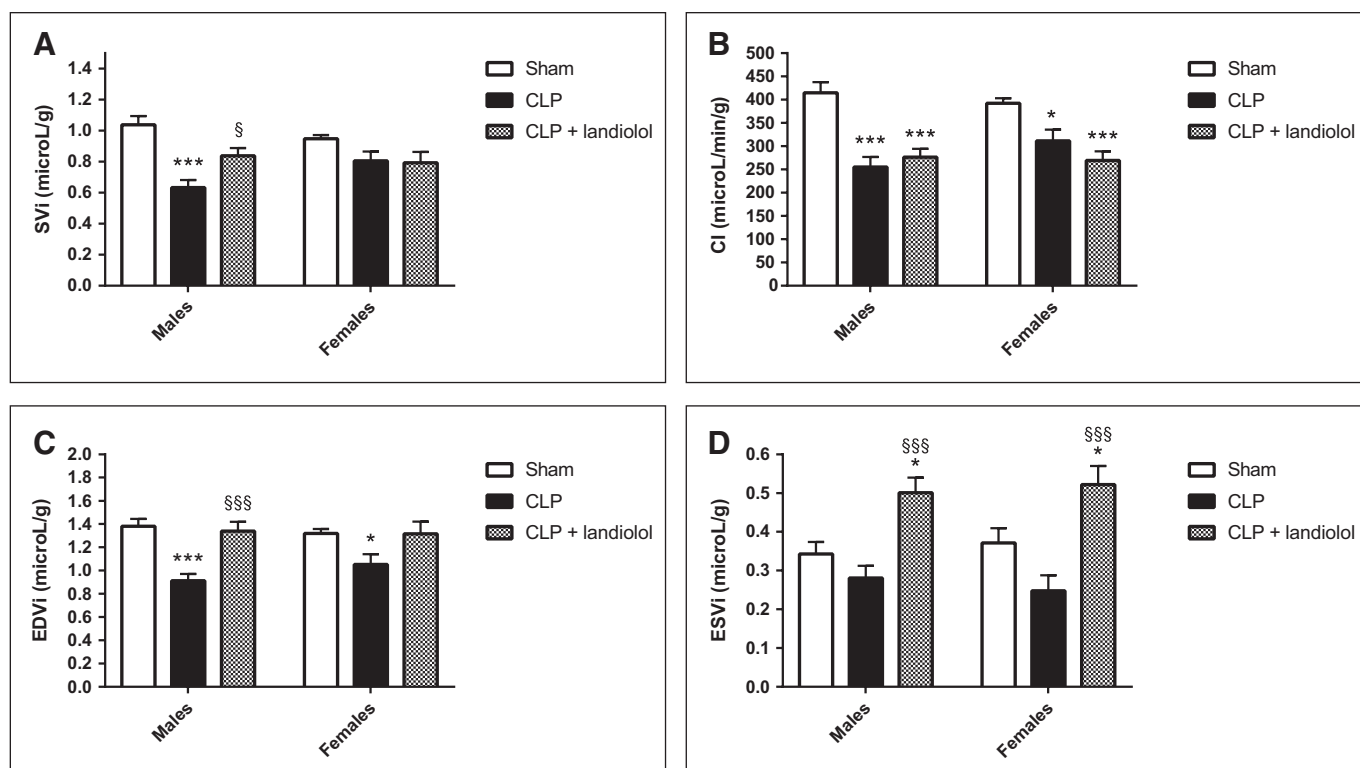


Figure 1. In vivo cardiac function using MRI after 18 hr. **A**, Indexed stroke volume (SVi). **B**, Cardiac index (CI). **C**, Indexed end-diastolic volume (EDVi). **D**, Indexed end-systolic volume (ESVi). Group mean value and standard error of the mean are represented. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus sham male and versus sham female, respectively. \$ $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.001$ versus cecal ligation and puncture (CLP) male and versus CLP female, respectively.

on LVEF, CI, and sWTN. This finding is in line with previous experimental studies (7, 20). Using a conductance catheter in male rats undergoing CLP, Kimmoun et al (5) also found improved myocardial function with β -blockers. A meta-analysis has shown an association between diastolic dysfunction and mortality in septic patients, so this may represent an important protective effect of β -blockers (23).

In contrast to septic males, septic females however maintained SVi at the level of sham females. Landiolol did not improve SVi, CI, and EDVi but decreased LVEF and sWTN. Cardiac performance ex vivo was more impaired in males than in females after endotoxin administration (10). In our in vivo study, landiolol improved cardiac performance in septic males but seemed deleterious in females. Although not yet formally examined in septic patients, women undergoing high-risk surgery did not benefit from perioperative β -blockers, a finding at variance with men (24). With exercise, the hemodynamic response to metoprolol in women resulted in a larger reduction of HR and blood pressure (25). Lindenfeld et al (26) showed that sex affects age-related β -AR down-regulation in normal human ventricles, suggesting an effect of sex hormones. Down-regulation of β -AR by estrogen may be a protective strategy in the case of hyperstimulation (27–29). The interaction between estrogen-receptors and β -AR may explain the sex-dependent response to β -blockers (29).

In our model, septic myocardial dysfunction was more pronounced in males. In an experimental model of fluid-resuscitated sepsis, Khaliq et al (30) compared the hemodynamic effects of esmolol in predicted survivors and predicted

nonsurvivors in a fecal peritonitis model using male rats only. In the predicted nonsurvivors, esmolol infusion was associated with an increase in SV, while CO remained stable, whereas SV and CO decreased with esmolol in predicted survivors. Thus, the underlying severity of the septic myocardial dysfunction may impact upon the response to β -blockers. In our study, landiolol did not alter myocardial blood perfusion nor indexed coronary flow in either gender. In septic patients, coronary flow is typically normal or increased (31).

Mitochondria are the predominant generators of ATP in most cell types. Cardiomyocyte mitochondrial dysfunction is characterized by ultrastructural damage, decreased activity of electron transport chain enzyme complexes, and an increase in reactive oxygen species production (32–34). In sepsis, mitochondrial dysfunction is associated with the degree of organ failure (35). Here, sepsis did not affect high-energy phosphate compounds and pH_i. Myocardial ATP content remained unchanged while LVDP decreased. In another model of sepsis using ^{31}P MRS, energetic variables were also stable despite alterations in cardiac function (36, 37), suggesting that energetic metabolism is not limiting cardiac function in sepsis. Conversely, using biochemical analyses, Escames et al (38) however found a decrease in ATP production in hearts from septic mice.

There was a sex-dependent effect on expression of genes involved in the inflammatory response in our septic animals. The lack of difference in tumor necrosis factor, IL-1 β , and IL-6 may reflect the late timepoint of collection of cardiac tissue (39). However, in line with a previous study, landiolol did not

TABLE 3. Ex Vivo Assessment Using Isolated Heart Rat Preparation After 19 Hours

Variables	Males			Females		
	Sham (n = 6), Mean $\pm$ SEM	CLP (n = 6), Mean $\pm$ SEM	CLP + Landiolol (n = 7), Mean $\pm$ SEM	Sham (n = 5) Mean $\pm$ SEM	CLP (n = 6), Mean $\pm$ SEM	CLP + Landiolol (n = 7), Mean $\pm$ SEM
Heart weight (g)	0.97 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.04 ^a	0.71 $\pm$ 0.02 ^a	0.64 $\pm$ 0.01 ^a
Ratio heart/body weight $\times$ 1,000	3.03 $\pm$ 0.11	2.81 $\pm$ 0.11	2.74 $\pm$ 0.06	3.23 $\pm$ 0.07	3.01 $\pm$ 0.09	2.94 $\pm$ 0.15
HR isolated heart (beats/min)	306 $\pm$ 27	331 $\pm$ 33	298 $\pm$ 18	302 $\pm$ 19	337 $\pm$ 16	247 $\pm$ 30
LVDP (mm Hg)	77 $\pm$ 6	47 $\pm$ 3 ^a	61 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5	47 $\pm$ 5 ^a	60 $\pm$ 18
Rate pressure product (LVDP $\times$ HR) (mm Hg/min)	22,961 $\pm$ 1,115	15,733 $\pm$ 2,035 ^b	17,876 $\pm$ 962 ^b	22,141 $\pm$ 1,746	15,678 $\pm$ 1,129 ^b	13,705 $\pm$ 1,373 ^b
Coronary flow indexed (mL/min/g)	18 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 0.9	18.4 $\pm$ 1.2	15.2 $\pm$ 2.5	12.5 $\pm$ 1.1 ^a	16.7 $\pm$ 0.9

CLP = cecal ligation and puncture, HR = heart rate, LVDP = left ventricular developed pressure.

^a $p < 0.05$ vs. male of the equivalent group.

^b $p < 0.05$ vs. sham male and vs sham female, respectively.

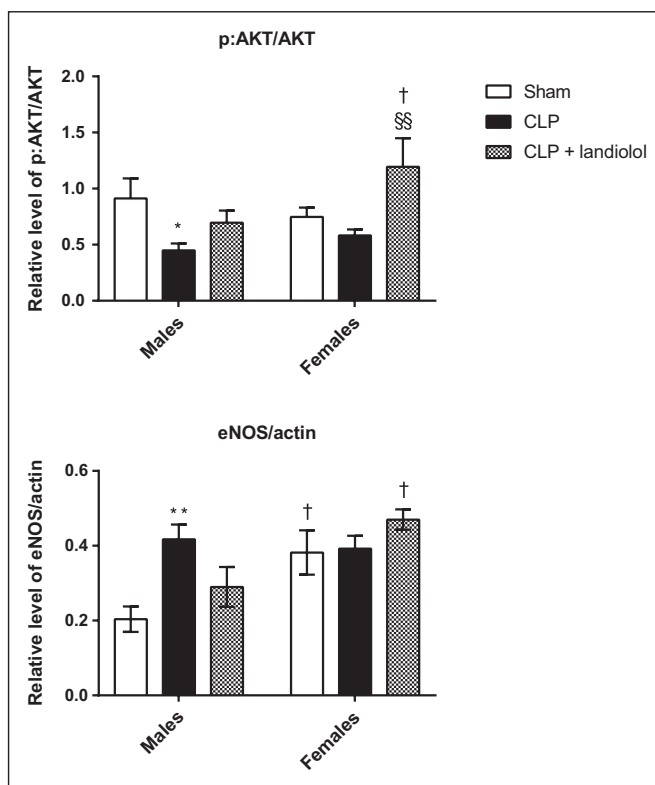


Figure 2. Phosphorylated-AKT (pAKT):AKT ratio and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression using Western blotting. Data are represented as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus sham male. §§ $p < 0.01$ versus cecal ligation and puncture (CLP) female. † $p < 0.05$ versus male of the equivalent group.

seem to interacting with most inflammatory pathways (40). Of note, landiolol acts predominantly on β 1-AR. As reported elsewhere (1), the mechanism of β 1-AR activation on inflammatory pathways remains unclear and at variance with that of β 2-AR activation.

NPR3 has an antiapoptosis role and protects cardiomyocytes (41). NPR3 decreased in both sexes after CLP, and landiolol could reverse this effect in the septic males only. In our model, we found a different expression of eNOS and pAKT:AKT in males and females. Females have a reduced susceptibility to cardiac ischemic injury with nitric oxide generation playing a pivotal protective role (42, 43). In a model of endotoxemia, the protection of the female heart was associated with the AKT/eNOS pathway (44). Kimmoun et al (5) also showed an increase in AKT and eNOS phosphorylation with esmolol in a model of sepsis. These pathways may thus be implicated in the different response to beta-blockers according to sex.

Our study has several limitations. The difference between the weight of males and females was significant; males initially weighed 1.4 times the female weight. Landiolol was administered according to the weight of each animal, and each variable was adjusted to weight. The ultrashort half-life of landiolol can have resulted in low tissue concentrations in the isolated heart (15). The isolated heart also removes the effects of circulating myocardial depressant factors that are implicated in sepsis-induced myocardial dysfunction, so this may not necessarily reflect the in vivo situation (45). Another limitation is the choice of the IV dose of landiolol, which was infused at a fixed dose. In our study, blood pressure remained constant in males but decreased in females. The dose could be adapted to an individual animal's response, since the pharmacokinetics of β -blockers depends on gender and age (25). Another limitation is that our study did not assess the baseline response to landiolol. Landiolol is hydrolyzed to an inactivate metabolite by esterases, which activities are higher in female rats than in male rats (46). Furthermore, the response to general anesthesia may be se -mediated (47), and hypothermia may affect the cardiac effects of β -blockers (48). Our septic rats did not develop

profound hypotension; thus, the role of norepinephrine was not assessed, requiring future studies. Furthermore, we studied young rats; most patients with sepsis are however postmenopausal, so our results may not necessarily reflect responses in older females.

CONCLUSIONS

Our model confirms that cardiac function was more impaired in septic males compared with their female counterparts. Landiolol ameliorated the cardiac dysfunction in males, particularly in relation to an improvement in diastolic function. Landiolol however produced deleterious effects in females. Phosphorylation of AKT and altered expression of eNOS and NPR3 are potential signaling pathways that merit further investigation in order to better understand sex differences.

REFERENCES

- de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, et al: Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 2009; 13:230
- Dünser MW, Hasibeder WR: Sympathetic overstimulation during critical illness: Adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med* 2009; 24:293–316
- 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; 330:1717–1722
- Desrois M, Kober F, Lan C, et al: Effect of isoproterenol on myocardial perfusion, function, energy metabolism and nitric oxide pathway in the rat heart - a longitudinal MR study. *NMR Biomed* 2014; 27:529–538
- Kimmoun A, Louis H, Al Kattani N, et al: β 1-Adrenergic inhibition improves cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Crit Care Med* 2015; 43:e332–e340
- Aboab J, Sebillé V, Jourdain M, et al: Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock. *Intensive Care Med* 2011; 37:1344–1351
- Suzuki T, Morisaki H, Serita R, et al: Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* 2005; 33:2294–2301
- Morelli A, Ertmer C, Westphal M, et al: Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: A randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310:1683–1691
- Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, et al: Gender differences in sepsis: Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 2014; 5:12–19
- Zhu H, Shan L, Peng T: Rac1 mediates sex difference in cardiac tumor necrosis factor- α expression via NADPH oxidase-ERK1/2/p38 MAPK pathway in endotoxemia. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47:264–274
- Leone M, Honstetter A, Lepidi H, et al: Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: Protective role of 17 β -estradiol. *J Infect Dis* 2004; 189:339–345
- Textoris J, Ban LH, Capo C, et al: Sex-related differences in gene expression following *Coxiella burnetii* infection in mice: Potential role of circadian rhythm. *PLoS One* 2010; 5:e12190
- Kneale BJ, Chowienzyk PJ, Brett SE, et al: Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1233–1238
- Hart EC, Charkoudian N, Wallin BG, et al: Sex and ageing differences in resting arterial pressure regulation: The role of the β -adrenergic receptors. *J Physiol* 2011; 589:5285–5297
- Iguchi S, Iwamura H, Nishizaki M, et al: Development of a highly cardioselective ultra short-acting beta-blocker, ONO-1101. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992; 40:1462–1469
- Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, et al: Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane. *MAGMA* 2004; 17:157–161
- Kober F, Iltis I, Izquierdo M, et al: High-resolution myocardial perfusion mapping in small animals *in vivo* by spin-labeling gradient-echo imaging. *Magn Reson Med* 2004; 51:62–67
- Desrois M, Caus T, Belles PM, et al: Limitation of myocardial and endothelial injury of the rat heart graft after preservation with Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMB) solution. *Transpl Int* 2008; 21:276–283
- Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, et al: Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 2010; 38:388–394
- Hagiwara S, Iwasaka H, Maeda H, et al: Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock* 2009; 31:515–520
- Morelli A, Singer M, Ranieri VM, et al: Heart rate reduction with esmolol is associated with improved arterial elastance in patients with septic shock: A prospective observational study. *Intensive Care Med* 2016; 42:1528–1534
- Mathieu C, Zieleskiewicz L, Leone M: Beta-blockers in septic shock: A magnifying glass on the relation heart vessel. *J Thorac Dis* 2016; 8:E802–E804
- Sanfilippo F, Corredor C, Fletcher N, et al: Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: A systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2015; 41:1004–1013
- Matyal R, Mahmood F, Panzica P, et al: Sex-related differences in outcome after high-risk vascular surgery after the administration of beta-adrenergic-blocking drugs. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2008; 22:354–360
- Luzier AB, Killian A, Wilton JH, et al: Gender-related effects on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:594–601
- Lindenfeld J, Cleveland JC Jr, Kao DP, et al: Sex-related differences in age-associated downregulation of human ventricular myocardial β 1-adrenergic receptors. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35:352–361
- Wu Q, Zhao Z, Sun H, et al: Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol* 2008; 93:1034–1043
- Kam KW, Qi JS, Chen M, et al: Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309:8–15
- Machuki JO, Zhang HY, Harding SE, et al: Molecular pathways of oestrogen receptors and β -adrenergic receptors in cardiac cells: Recognition of their similarities, interactions and therapeutic value. *Acta Physiol* 2017; 46:e12978
- Khalil W, Andreis D, Singer M: Beta-blockade in experimental fluid-resuscitated sepsis: Acute haemodynamic effects of esmolol differ in predicted survivors and non-survivors. *Intensive Care Med Exp* 2015; 3:A801
- Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, et al: Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 1987; 75:533–541
- Rudiger A, Singer M: Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35:1599–1608
- Smeding L, Plötz FB, Groeneveld AB, et al: Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. *Shock* 2012; 37:449–456
- Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, et al: Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 2015; 16:17763–17778
- Singer M: The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; 5:66–72
- Sikes PJ, Zhao P, Maass DL, et al: Sodium/hydrogen exchange activity in sepsis and in sepsis complicated by previous injury: ^{31}P and ^{23}Na NMR study. *Crit Care Med* 2005; 33:605–615

37. Solomon MA, Correa R, Alexander HR, et al: Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol* 1994; 266:H757–H768
38. Escames G, López LC, Ortiz F, et al: Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007; 274:2135–2147
39. Lesur I, Textoris J, Lloriod B, et al: Gene expression profiles characterize inflammation stages in the acute lung injury in mice. *PLoS One* 2010; 5:e11485
40. Matsuishi Y, Jesmin S, Kawano S, et al: Landiolol hydrochloride ameliorates acute lung injury in a rat model of early sepsis through the suppression of elevated levels of pulmonary endothelin-1. *Life Sci* 2016; 166:27–33
41. Lin D, Chai Y, Izadpanah R, et al: NPR3 protects cardiomyocytes from apoptosis through inhibition of cytosolic BRCA1 and TNF- α . *Cell Cycle* 2016; 15:2414–2419
42. Di Lisa F: A female way to protect the heart: Say NO to calcium. *Circ Res* 2006; 98:298–300
43. Sun J, Picht E, Ginsburg KS, et al: Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel α 1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2006; 98:403–411
44. Chen J, Chiazza F, Collino M, et al: Gender dimorphism of the cardiac dysfunction in murine sepsis: Signalling mechanisms and age-dependency. *PLoS One* 2014; 9:e100631
45. Joulin O, Petillot P, Labalette M, et al: Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction. *Physiol Res* 2007; 56:291–297
46. Illsley NP, Lamartiniere CA: Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity. *Endocrinology* 1981; 108:1737–1743
47. Zambricki EA, Daley LG: Rat sex differences in anesthesia. *Comp Med* 2004; 54:49–53
48. Melnikov AL, Løkebo JE, Helgesen KG, et al: Influence of hypothermia on the cardiac effects of propranolol observed in isolated rat atria. *Gen Pharmacol* 1997; 28:55–59

Supplemental procedure content 1

Supplemental Data

Material and Methods

Animals and cecal ligation and puncture model

Anesthesia was maintained during the surgical procedure with 1.5-2% isoflurane. Buprenorphine (0.05 mg/kg) was administered subcutaneously and temperature maintained at 37°C. Under sterile conditions, a catheter (PE50, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) was inserted into the right external jugular vein and tunneled subcutaneously to the back of the neck where it was attached to a swivel device.

A laparotomy was performed and the cecum ligated just below the ileo-cecal valve, maintaining bowel continuity, and then punctured twice with an 18-gauge needle. Gentle pressure was applied to extrude a droplet of fecal matter from each puncture site. The cecum was then re-inserted into the peritoneal cavity and the incision closed by sutures. For sham-operated rats, the procedure was identical but without ligation and puncture. After surgery, the jugular catheter was connected to a swivel device allowing the rat to move freely in its cage and *ad libitum* access to chow and water. After surgery, all animals received a n-saline infusion (10 mL/kg) over 30 minutes.

MRI assessment of in vivo cardiac function

A warming pad was placed on the back of the animal and body temperature recorded by a rectal probe. All images were acquired using a Bruker Biospec 4.7T/30 imager (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). Animals were placed prone on an actively decoupled surface coil (Rapid Biomedical, Rimpur, Germany) used for radiofrequency reception. Homogeneous radiofrequency excitation was achieved using a proton volume resonator (diameter 60 mm; homogeneous length 80 mm). Ventilation was monitored using a pressure sensor connected to an air-filled balloon positioned under the abdomen. The electrocardiogram (ECG) was monitored by siting two subcutaneous thoracic electrodes and HR was recorded. An ECG and respiration trigger unit (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany) was used to gate the MR sequences.

A gradient-echo cine-MRI sequence was used to acquire strictly perpendicular slices in two- and four-chamber long-axis orientation and short-axis orientation at mid-ventricular level (FLASH, field of view, 4×4 cm²; slice thickness = 2 mm; matrix size = 128 × 128; TR = 5.1 ms; TE = 1.6 ms; 45 phases per cardiac trigger). Image post-processing was performed using

an in-house developed program running under an IDL environment (Interactive Data Language, ITT Visual Solutions, Boulder, CO, USA). The program displays the acquired cine-MRI image series and allows manual determination of left ventricular areas and lengths in a selected cardiac phase. Left ventricular volumes were determined using an ellipsoid model, with the left ventricle assimilated to an ellipsoid of revolution. Endocardial and epicardial areas were manually delineated on short-axis images, with ventricular lengths determined from four-chamber long-axis views in diastole and systole, respectively.

In vivo myocardial perfusion using cine-ASL technique

An ECG- and respiration-gated Look–Locker gradient-echo flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) ASL technique was used to acquire two T1 maps from a single short-axis slice placed at ventricular mid-level, one after a slice selective inversion pulse and one after a global inversion pulse. The following parameters were used: field of view = 4×4 cm²; slice thickness = 3 mm; matrix size = 128×64 ; flip angle = 12°. The number of acquired signals was typically 40 at a heart rate of 310 beats/min leading to acquisition times of approximately 25 min. Image analyses were performed using a home-made program running in an IDL environment. For FAIR-ASL, the program performs pixel-by pixel least-squares fitting of an exponential inversion-recovery (T1) model to the two image series data (global and slice-selective inversion recovery). This results in two T1 maps, which are subsequently processed as described previously (17). As a result, a map of quantitative absolute myocardial blood flow (MBF) is available to the user. Using the same program, the generated MBF maps were evaluated by manually delineating regions of interest in the entire left ventricular myocardium to yield average and standard deviation within the myocardial region.

Isolated rat heart preparation for ex vivo cardiac function and ³¹P MRS

The aorta was cannulated and the heart retrogradely perfused at constant pressure with 37°C Krebs-Henseleit solution (containing in mmol/L: NaCl 118; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 1.75; ethylenediaminetetraacetate 0.5; NaHCO₃ 25; D-Glucose 11; pH 7.4) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂.

The appropriate conditions for acquiring ³¹P magnetic resonance spectra and the quantification of phosphorus metabolites have been detailed previously (4,18). Briefly, a series of 8 spectra (4 min acquisition each) were recorded to determine phosphocreatine (PCr), adenosine triphosphate (ATP), inorganic phosphate (Pi), phosphomonoesters (PME) and

intracellular pH (pHi). Cardiac function and ^{31}P MR spectra were simultaneously monitored during the perfusion protocol. For the quantification of gene expression and biochemical analyses, hearts were rapidly freeze-clamped with a Wollenberger clamp precooled in liquid nitrogen and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ before analysis.

Ribonucleic acid (RNA) extraction and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from the left ventricles using TRIzol Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The quality of RNA was confirmed on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using the Agilent RNA 6000 Nano chips. The concentration of RNA was determined by reading absorbance at 260/280 nm on a NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RIN (RNA Integrity Number) ranged from 1.8 to 2.0, indicating good integrity of the RNA. cDNA synthesis was carried out with superscript VILO MasterMix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Bleiswijk, Netherlands) on 1 μg of total RNA in 20 μl of final volume. Quantitative real-time PCR (qPCR) analyses of genes and housekeeping gene using SYBR Green PCR master mix (Applied Bio-systems, Life technologies, UK) were performed on the Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). The expression levels of candidate genes were normalized to RPL32 and the delta CT (cycle threshold) value used for subsequent statistical analysis.

Immunoblotting and western-blot

Total protein was extracted from frozen LVs in RIPA lysis buffer supplemented with PMSF and protease inhibitors cocktail at 4°C (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Protein quantification was performed with Q-Bit protein assay (Thermo). Protein extracts were denatured in SDS loading buffer supplemented with DTT. Lysates of 50-100 μg were then subjected to electrophoresis using the NuPAGE® Bis-Tris gels (4-12%) (Invitrogen) and were blotted to nitrocellulose membrane using the iBlot2® gel transfer system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Blots were probed with the following antibodies: actin (Millipore MAB1501, 1/5000), Akt (Cell Signaling 9272, 1/1000), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) type III (BD Biosciences 610296, 1/1000) and Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling 9271, 1/1000). After washing, HRP-conjugated secondary antibodies were used. Blots were treated with ECL reagent (Western Lightning Ultra, Perkin Elmer). After exposure and scanning of films, analysis was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD,

USA). These experiments were based on the results of a prior study assessing the effects of esmolol on cardiac dysfunction in sepsis (5).

Biochemical analyses in plasma

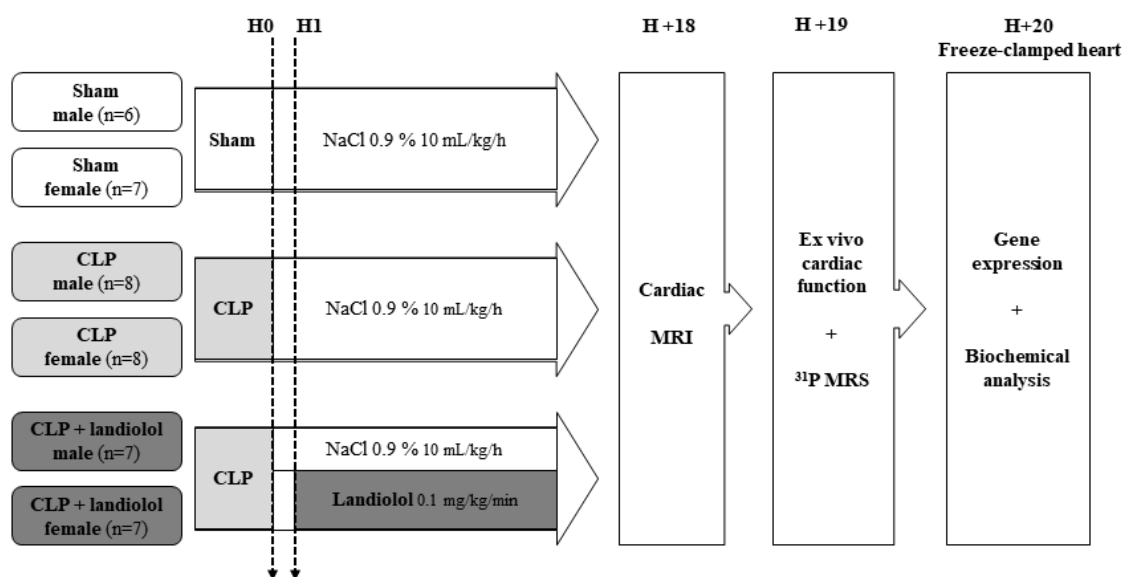
Plasma lactate concentration was measured using an assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Result

Effects of CLP and landiolol on myocardial gene expression

Genes encoding signaling proteins known for their role in cardiac and immune function are detailed in Supplemental Table 2 (Supplemental Digital Content 4,), <http://links.lww.com/CCM/D506>). IL-6, TNF-alpha, and IL-1beta expression did not differ between groups. Regarding the steroid receptors, expression of the glucocorticoid (NR3C1), mineralocorticoid (NR3C2), estrogen (ESR1) and beta1-adrenergic (ADRB1) receptors were similar after CLP in males and females. Landiolol had no significant impact (Table 5). Expression of blood pressure regulators (natriuretic peptide receptor NPR1, NPR2, NPR3, endothelin-1 receptor (EDNRA), angiotensin type-1A (AT1-AR), angiotensin type-2 receptors (AT2-R), angiotensin II Receptor Associated Protein (AGTRAP)) were also determined. The expression of genes encoding proteins involved in the calcium-signaling pathway was also evaluated. In males, no effect of CLP was observed on transcript levels of phospholamban (PLN), ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting 2 (ATP2A2) and ryanodine receptor 2 (RYR2). In females, RYR2 expression was decreased after CLP with landiolol reversing this effect.

Supplemental procedure content 2



Supplemental Digital Content 5

Supplemental Figure 1: Experimental procedure. CLP: cecal ligation and puncture; MRI: magnetic resonance imaging; ^{31}P MRS: ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. All rats were equipped with a right jugular catheter before experimental procedure. After surgery, all animals received a normal saline infusion (10 mL/kg) for 30 minutes.

Supplemental Digital Content 3

Supplemental Table 1: ^{31}P magnetic resonance spectroscopy measurements of myocardial energy metabolism and pHi after 19 hours.

Variables	Males			Females		
	Sham (n=6)	CLP (n=6)	CLP + landiolol (n=7)	Sham (n=5)	CLP (n=7)	CLP + landiolol (n=6)
Phosphocreatine (PCr) (mM)	8.81 ± 0.46	8.75 ± 0.53	9.73 ± 0.60	6.31 ± 0.86	8.14 ± 0.95	8.59 ± 0.65
Adenosine triphosphate (ATP) (mM)	8.19 ± 0.93	7.59 ± 0.90	7.94 ± 0.87	7.31 ± 0.99	8.06 ± 0.71	5.92 ± 0.76
Phosphomonoesters (mM)	2.21 ± 0.29	2.37 ± 0.38	2.46 ± 0.59	2.82 ± 0.62	2.09 ± 0.67	2.72 ± 0.32
Inorganic phosphate (mM)	1.75 ± 0.33	2.89 ± 0.50	2.65 ± 0.61	2.77 ± 0.66	2.21 ± 0.50	3.59 ± 0.62
Intracellular pH (pHi)	7.09 ± 0.03	7.17 ± 0.03	7.11 ± 0.03	7.15 ± 0.04	7.15 ± 0.04	7.16 ± 0.06
PCr/ATP ratio	1.19 ± 0.10	1.27 ± 0.12	1.37 ± 0.20	0.95 ± 0.20	1.08 ± 0.13	1.65 ± 0.28

Data are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). CLP: cecal ligation and puncture

Supplemental Digital Content 4

Supplemental Table 2: Effects of cecal ligation and puncture and landiolol on expression levels of different genes after 20 hours.

Variables	Males			Females		
	Sham (n=6)	CLP (n=8)	CLP + landiolol (n=7)	Sham (n=7)	CLP (n=8)	CLP + landiolol (n=7)
<i>Proinflammatory Molecules</i>						
IL-6	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.3	1.6 ± 0.4
TNF-α (4)	1.8 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.6 ± 0.3	1.7 ± 0.4	2.1 ± 0.5	2.9 ± 0.8
IL-1β (4)	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.6	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.5
IL-18	6.4 ± 0.3	5.5 ± 0.1 ^a	4.8 ± 0.2 ^a	6.4 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.1 ± 0.1 ^a
Cox-2	3.0 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	2.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4
TREM1	7.5 ± 0.2	6.2 ± 0.2 ^a	6.2 ± 0.2 ^a	6.6 ± 0.5	6.6 ± 0.2	6.3 ± 0.1
<i>Anti-inflammatory Molecules</i>						
IL-10	10.5 ± 0.6	7.6 ± 0.7 ^a	7.3 ± 0.3 ^a	10.8 ± 0.5	8.5 ± 0.3 ^a	8.1 ± 0.4 ^a
IL-1ra	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.2 ± 0.2	5.6 ± 0.4 ^c	4.6 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.2
IL-15	4.9 ± 0.2	6.3 ± 0.3	5.2 ± 0.2	4.8 ± 0.3	6.9 ± 0.7 ^a	5.3 ± 0.3 ^b
<i>Steroid Receptors</i>						
NR3C1 (4)	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.4	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.2
NR3C2 (4)	4.0 ± 0.4	4.1 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.5	3.6 ± 0.2	3.9 ± 0.1
ESR1	6.6 ± 0.3	6.7 ± 0.4	6.9 ± 0.3	6.8 ± 0.5	7.5 ± 0.5	6.9 ± 0.2
<i>Hormone Receptors</i>						
NPR1 (4)	4.0 ± 0.3	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.4	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.1
NPR2 (4)	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.1
NPR3	3.7 ± 0.3	5.7 ± 0.3 ^a	4.6 ± 0.2	4.2 ± 0.2	6.0 ± 0.3 ^a	6.0 ± 0.6 ^{a,c}
EDNRA (4)	3.0 ± 0.4	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1
AT1-AR	8.1 ± 0.8	8.5 ± 0.3	7.8 ± 0.5	8.9 ± 0.3	8.3 ± 0.5	8.3 ± 0.6
AT2-R	9.7 ± 0.8	10.0 ± 0.4	9.5 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.6 ± 0.7	8.8 ± 0.7
AGTRAP (4)	5.0 ± 0.4	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.1
ADRB1	8.7 ± 0.3	8.1 ± 0.2	8.3 ± 0.2	8.2 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.8 ± 0.2
<i>Calcium Signaling</i>						
PLN	-3.2 ± 0.2	-2.8 ± 0.2	-3.0 ± 0.2	-3.4 ± 0.3	-2.8 ± 0.1	-3.0 ± 0.3
ATP2A2	-3.7 ± 0.3	-3.4 ± 0.3	-3.3 ± 0.4	-3.8 ± 0.3	-2.9 ± 0.4	-3.2 ± 0.2
RYR2	-1.7 ± 0.2	-1.4 ± 0.1	-1.8 ± 0.2	-1.9 ± 0.2	-1.3 ± 0.2 ^a	-1.6 ± 0.1
<i>Contractile Apparatus</i>						
cTNI	6.4 ± 0.4	7.3 ± 0.1	6.7 ± 0.3	5.4 ± 0.3 ^c	6.4 ± 0.2 ^a	6.3 ± 0.2
<i>Nitric Oxide Synthase</i>						
eNOS (4)	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.1
iNOS	6.8 ± 0.5	8.5 ± 0.4 ^a	8.1 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.2	8.3 ± 0.3 ^a	8.5 ± 0.4 ^a

Data are expressed as average delta cycle threshold (deltaCT) and RPL32 is the housekeeping gene; the lower the deltaCT value, higher the expression. Data are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Note that expression levels were calculated with only 4 biological replicates for genes annotated (4). CLP: cecal ligation

and puncture; IL: interleukin; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; Cox-2: cyclooxygenase 2; TREM1: triggering receptor expressed on myeloid cells 1; NR3C1: glucocorticoid receptor, NR3C2: mineralocorticoid receptor, ESR1: estrogen receptor; NPR: natriuretic peptide receptor; EDNRA: endothelin-1 receptor; AT1-AR: angiotensin type 1A receptor; AT2-R: angiotensin type 2 receptor; AGTRAP: angiotensin II receptor associated protein; ADRB1: beta1-adrenoreceptor; PLN: phospholamban; ATP2A2: ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting 2; RYR2: ryanodine receptor 2; cTNI: cardiac troponin I; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; iNOS: inducible nitric oxide synthase

^a $p < 0.05$ vs. *sham male and vs. sham female, respectively*;

^b $p < 0.05$ vs. *CLP female*;

^c $p < 0.05$ vs. *male of the equivalent group*.

1.3. Synthèse de l'article 1

Des IRM, réalisées chez le mâle 18h après la CLP, ont montré que le landiolol augmente le volume systolique indexé (SVi) en reversant le volume de fin de diastole indexé (EDVi) sans affecter la fraction d'éjection ventriculaire gauche (LVEF). Chez la femelle, le landiolol ne modifie ni le SVi, ni le EDVi mais diminue la LVEF. Des expériences *ex vivo* sur cœur isolé, en conditions isovolumiques et en spectroscopie à résonance magnétique en présence de P31, n'ont montré aucun effet sur la fonction cardiaque *ex vivo* ni sur les composés phosphates riches en énergie. Par contre, nous avons observé des différences importantes selon le genre dans l'expression de certains gènes comme le récepteur aux peptides natriurétiques (NPR3) et celle des protéines telles que eNOS et AKT, en particulier le ratio AKT-phosphorylé/AKT. En conclusion, le landiolol améliore les performances cardiaques *in vivo* chez le mâle septique alors qu'il induit des effets délétères chez la femelle.

2. Étude 2

2.1. Contexte de l'étude 2

Suite aux résultats obtenus précédemment dans les rats septiques traités au landiolol, qui montraient un comportement différent entre mâles et femelles, nous avons choisi de rechercher les processus moléculaires à l'origine de cette différence. Pour cela, nous avons réalisé une étude transcriptomique à partir de prélèvements des ventricules gauches provenant des animaux précédemment analysés en IRM (étude 1).

2.2. Article 2

Cette deuxième étude a fait l'objet d'un article où je suis première auteure, publié dans *Intensive Care Medicine Experimental*, DOI : 10.1186/s40635-019-0263-0.

RESEARCH

Open Access



Effect of landiolol on sex-related transcriptomic changes in the myocardium during sepsis

Thi Thom Tran¹, Calypso Mathieu², Magali Torres¹, Béatrice Loriod^{1,3}, Linh Thuy Lê¹, Catherine Nguyen¹, Monique Bernard⁴, Marc Leone^{2*} and Nathalie Lalevée^{1*}

* Correspondence: marc.leone@ap-hm.fr; nathalie.lalevee@univ-amu.fr

²Aix Marseille Univ, Service d'anesthésie et de réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Chemin des Bourrely, 13015 Marseille, France
¹Aix-Marseille Univ, INSERM UMR 1090, TAGC, Campus de Luminy, Case 928, 13288 Marseille Cedex 9, France

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

Abstract

Objectives: The aims of this study are to better understand phenotypic differences between male and female rats during sepsis, to characterise the contribution of the beta1-adrenergic blocker landiolol to septic cardiomyopathy and to determine why landiolol induces divergent effects in males and females.

Methods: The myocardial transcriptional profiles in male and female Wistar rats were assessed after the induction of sepsis by cecal ligation and puncture and addition of landiolol.

Results: Our results showed major differences in the biological processes activated during sepsis in male and female rats. In particular, a significant decrease in processes related to cell organisation, contractile function, ionic transport and phosphoinositide-3-kinase/AKT (PI3K/AKT) signalling was observed only in males. The transcript of ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 3 (SERCA3) was sex-differently regulated. In males, landiolol reversed several signalling pathways dysregulated during sepsis. The expression level of genes encoding tubulin alpha 8 (TUBA8) and myosin heavy chain 7B (MYH7) contractile proteins, phosphatase 2 catalytic subunit alpha (PPP2CA), G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) and A-kinase anchoring protein 6 (AKAP6) returned to their basal levels. In contrast, in females, landiolol had limited effects.

Conclusion: In males, landiolol reversed the expression of many genes that were deregulated in sepsis. Conversely, sepsis-induced deregulation of gene expression was less pronounced in females than in males, and was maintained in the landiolol-treated females. These findings highlight important sex-related differences and confirm previous observations on the important benefit of landiolol intake on cardiac function in male rats.

Keywords: Genes, Dimorphism, Sex, Sepsis, Beta-blocker, Transcriptome

Background

The pathophysiology of sepsis involves a complex mix of systemic factors and molecular, metabolic and structural changes in cardiomyocytes [1]. These include the presence of circulating depressant factors, such as endotoxin and nitric oxide [2], pro-inflammatory cytokines [3], myocyte cell death, abnormal cardiac energetics [4, 5], alterations in adrenergic signalling and intra-cellular calcium cycling, impaired electromechanical coupling and mitochondrial dysfunction [6].

The adrenergic system plays a key role in sepsis, and β -adrenergic modulation as a therapeutic intervention needs to be properly understood [7, 8]. β -blockers showed promising results when the treatment was started before the septic insult or after haemodynamic stabilisation [9–11]. In patients with septic shock, the β -blocker esmolol reduced the heart rate, increased the stroke volume and reduced the need for norepinephrine [10]. In experimental models of sepsis, a selective β 1-blocker efficiently improved both cardiac and vascular functions and down-regulated inflammatory pathways [12–16]. Differences in transcripts in the β -adrenergic signalling, calcium cycling pathways and impaired electromechanical coupling were linked with an unfavourable outcome [17]. Regarding gene expression, to our knowledge, no large-scale studies have been conducted on the effect of a selective β 1-blocker in experimental models of sepsis.

There is increasing evidence of sex-related differences in the cardiovascular system [18, 19], in the response to β -blockers [20, 21] and in the host response to an inflammatory insult [22–25]. In experimental models of sepsis, cardiac performance was more impaired in males as compared with that in females [25, 26]. Male mice exhibited dysregulation of myocardial calcium transporters, in particular the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) [27, 28] and female mice developed cardiac dysfunction as a result of cyclic guanosine monophosphate-mediated depression of myofilament function [29].

In our recent study, we showed for the first time sex-related disparities in the response to the β -blocker landiolol in rats with sepsis-induced myocardial dysfunction [26]. This data showed that landiolol improved the *in vivo* cardiac performance in male rats exposed to cecal ligation and puncture (CLP), whereas it induced deleterious effects in female rats. We confirmed the presence of sex-related differences in inflammatory response, calcium signalling and apoptosis pathways during sepsis [26].

This data raised the question of the origin of sex-related phenotypic differences during sepsis and in response to landiolol. To answer these questions, we conducted a transcriptional study in the septic male and female rat hearts and investigated the biological processes reversed by landiolol infusion.

Material and methods

Animals

Male and female Wistar rats aged 9–12 weeks were reused from a recent study [26]. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of Aix-Marseille University (APAFIS number: 3746-201601221813985). This allowed us to correlate the results of the transcriptomic analysis in this study with the *in vivo* findings obtained in our earlier study on the cardiac status performance. In addition, it reduced the number of animals used for experimentation [26].

Experimental protocol

The experimental procedure was described earlier [26]. Briefly, 1 h after CLP, the animals were randomized to receive landiolol (AOP Orphan, Vienna, Austria), diluted in n-saline that did not contain antibiotics and infused at $0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, or n-saline ($10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The infusion volume was similar in all the groups. Buprenorphine

(0.05 mg kg⁻¹) was used for pain control before surgical procedure. The 43 animals were distributed into six groups: a sham group (males, $n = 6$; females, $n = 7$), a CLP group (males, $n = 8$; females, $n = 8$) and a CLP plus landiolol group (males, $n = 7$; females, $n = 7$). No animals died prematurely from sepsis. At hour 18, in vivo cardiac magnetic resonance imagings (MRIs) were performed followed by ex vivo cardiac function measurement using Langendorff isolated heart preparation. At hour 20, animals were sacrificed and the hearts were frozen. The left ventricle tissues were used for RNA preparation. Three hearts (two CLP male and one sham female) were not frozen due to handling problems. Eight RNA samples were discarded because of their insufficient quality (low RNA integrity number (RIN)) or quantity. Quantification of gene expression was performed on 32 RNA samples from the sham (males, $n = 5$; females, $n = 5$), CLP (males, $n = 5$; females, $n = 5$) and CLP plus landiolol (males, $n = 6$; females, $n = 6$) groups.

RNA preparation

Total RNA was isolated from the left ventricle using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, California). The concentration of RNA was determined by reading the absorbance at 260 nm using a NanoDrop (ND-1000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA). The ratio of A260/280 in all the RNA samples ranged from 1.8 to 2.0. The quality of RNA was confirmed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany) with Agilent RNA 6000 Nano Chips. Samples with a RIN higher than 8 were used in a microarray.

Gene expression measurements

Gene expression was measured using a SurePrint G3 Rat GE8x60K Microarray Kit (Agilent Technologies, CA, USA) containing 62,976 oligonucleotide probes representing 30,003 genes. Total RNAs (200 ng) were labelled with cyanine 3-CTP using a Low RNA Input Linear Amplification Kit according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, CA, USA). For each reaction, the cRNA yield and specific activity of cRNA were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Only the cRNAs with yields of > 0.9 µg and specific activities > 6.0 pmol of dye per microgram of cRNA were used for hybridisation. The labelled cRNAs were hybridised to microarray slides (eight arrays per slide) following the Agilent One-Color microarray-based gene expression analysis protocol (Agilent Technologies, CA, USA). The slides were scanned (8 × 60 k array slides at 3 µm resolution) using an Agilent DNA microarray scanner (G2505C) and colour setting of an Agilent G3_GX_1. The scanned images were analysed using Feature Extraction Software 10.5 (Agilent).

Statistical analysis

Statistical evaluation determined that the number of rats required for in vivo experiments to show a 30% increase in SV by landiolol with a power and an alpha risk of 80% and 5%, respectively, was six per group. From the 6–8 animals per group tested in vivo, 5–6 hearts per group were selected as described in the above experimental protocol and used for gene expression quantification. No statistical evaluation was a priori performed but five biological replicates per group are empirically required for common

designs [30]. In total, 32 raw data files (five arrays for the sham, five arrays for the CLP and six arrays for the CLP plus landiolol groups, for each sex) were obtained using the Agilent Feature Extraction Software. The raw intensity data were exported as a single Excel spread sheet, and the raw data was converted in log2. Quantile normalisation was then applied to correct for global intensity and dispersion, and an 80% filtering was used to keep only genes expressed over the background noise. This procedure generated 38,223 probes in males and 37,605 probes in females. All the microarray data files are accessible at NCBI's Gene Expression Omnibus website (accession number: GSE125042). To detect significant variation in gene expression between groups (CLP group vs sham group and CLP plus landiolol group vs CLP group), the significance analysis of microarrays (SAM) method was used, with 10,000 permutations applied with a false discovery rate (FDR) of 1% or 5%. Hierarchical clustering of differentially expressed genes (DEGs) was achieved using the TM4 Microarray Software Suite V4.9 (<http://mev.tm4.org>) and average linkage clustering metrics. Pearson's correlation was used to determine the distance. Venn diagrams were generated to quantify sex-related differences in common and specific DEGs in the various groups.

Functional annotations

For biological interpretation of the gene expression data, enriched functional annotations for the up- and down-regulated genes were identified using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>). Biological processes, cellular components and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were considered significantly enriched when P -Benjamini < 0.05 . The KEGG pathways (<http://www.genome.jp/kegg/>) were also used when no significant biological processes were found in DAVID. Cytoscape was used to design the gene network of CLP genes whose expression was reversed after landiolol administration (<http://www.cytoscape.org>).

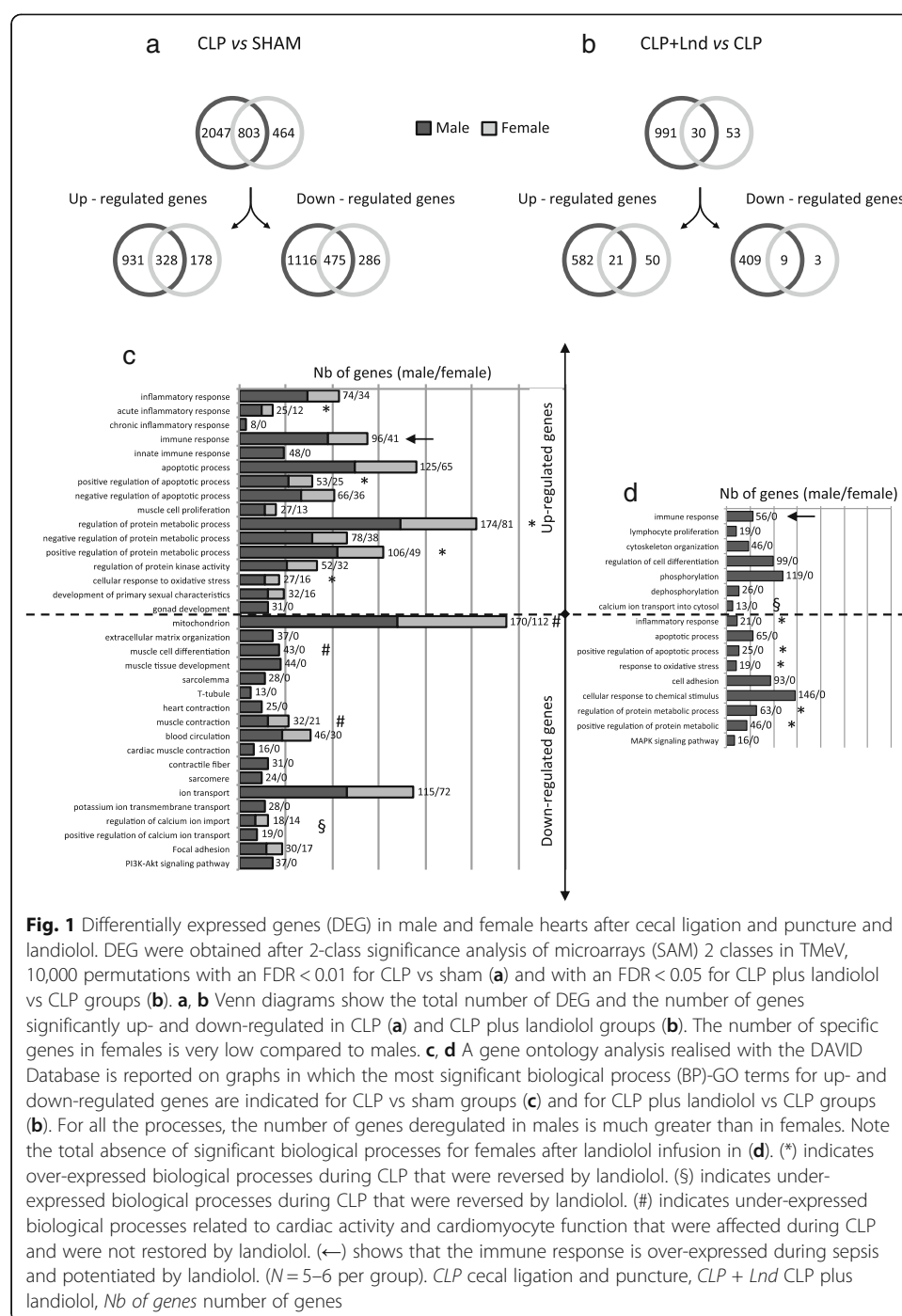
Results

Sex-related differential expression of genes in the CLP group and CLP plus landiolol group

In the males, the comparison of DEGs in the sham and CLP groups revealed 2850 DEGs (1259 up-regulated genes and 1591 down-regulated genes). In the females, only 1267 DEGs were found (506 up-regulated genes and 761 down-regulated genes). Males and females shared 803 DEGs, including 328 up-regulated genes (26% of male genes and 64% of female genes) and 475 down-regulated genes (30% of male genes and 62% of female genes) (Fig. 1a).

In the CLP plus landiolol group, 1021 DEGs and 83 DEGs were differently regulated in males and females, representing 603 and 71 up-regulated genes and 418 and 12 down-regulated genes (Fig. 1b). Further, 60 and 86% of DEGs were up-regulated in males and females, respectively. The lists of DEGs are shown in the Additional file 1.

To assess CLP-related functional annotations, we used biological processes, gene ontology terms and KEGG pathways using the DAVID database for the 2850 and the 1267 DEGs from males and females, respectively. For up-regulated genes, the most significant biological processes were associated with inflammatory and immune responses,



apoptosis, metabolism, oxidative stress, muscle cell proliferation, protein kinase activity and the development of primary sexual features. For down-regulated genes, the biological processes were related to mitochondrion, muscular cell organisation (organelles, myocyte membrane and contractile proteins), muscle contraction, blood circulation, ionic transport and phosphoinositide-3-kinase/AKT (PI3K/AKT) signalling pathway. These changes in gene expression were predominantly found in males (Fig. 1c, Additional file 3: Table S1). For example, in the male CLP group, the transcript levels of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)

pathway interleukin (IL) 10, IL6R, JAK, STAT and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) were increased, while CycD (CCND1) and B cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2) were decreased. In the CLP female group, IL10, p21 and BCL2 were not regulated (Additional file 1).

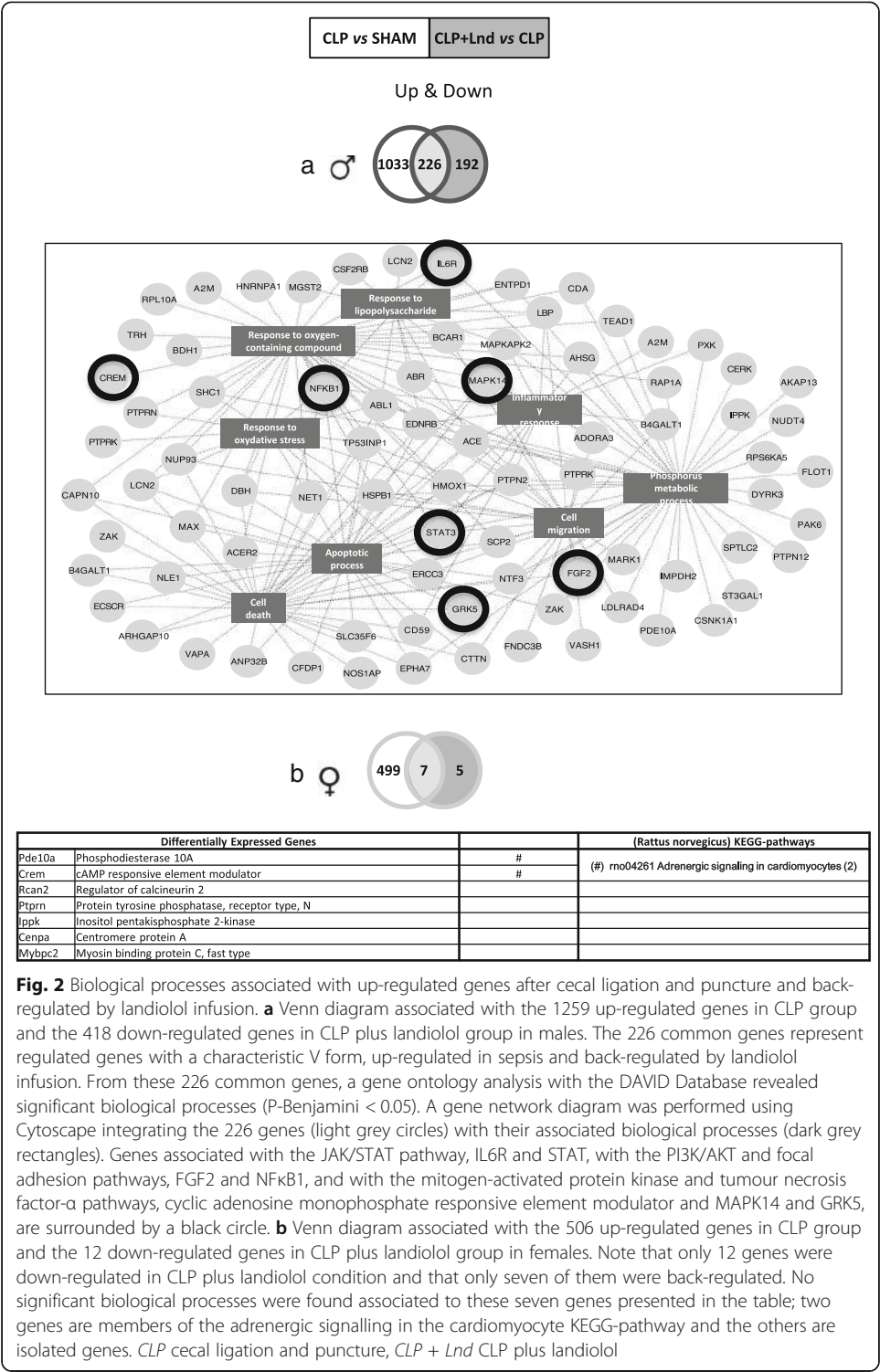
In males, landiolol down-regulated genes of the biological processes were related to up-regulated genes of the inflammatory response, apoptosis, metabolism and oxidative stress. In contrast, immunity-related signalling further increased after landiolol. Genes associated with other biological processes (i.e. ionic transport, cell differentiation and cytoskeleton organisation), which were down-regulated in the male CLP group, were up-regulated after landiolol. Due to the low number of DEGs in the female rats, neither up- nor down-regulated genes were associated with significant biological processes (Fig. 1d, Additional file 3: Table S2).

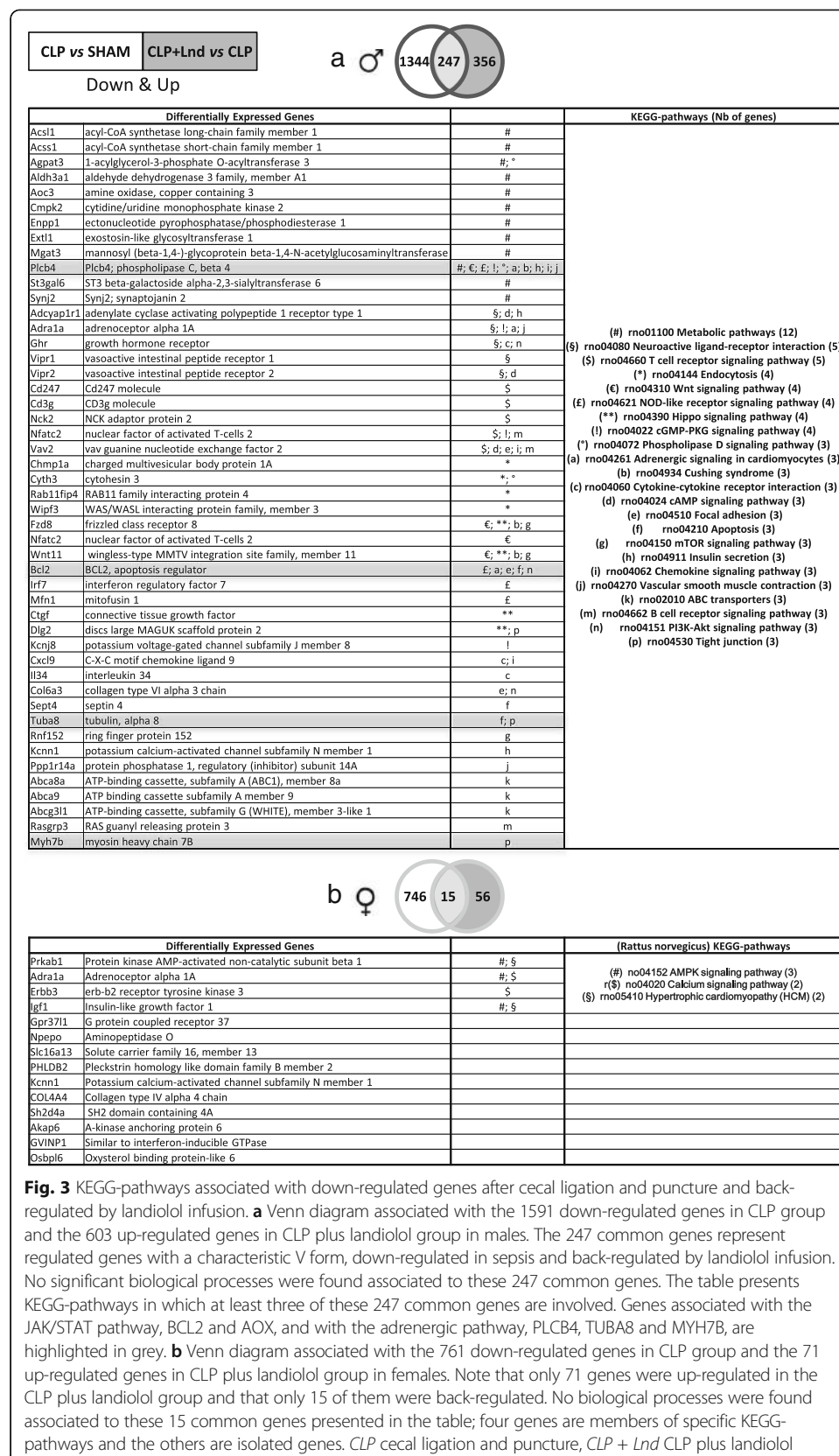
DEGs in the CLP group with reverted expression in the CLP plus landiolol group

To better understand the mechanisms resulting in cardiac performance improvement with landiolol, we assessed genes with a V-form expression, meaning that genes up- or down-regulated in sepsis compared to sham were back-regulated after landiolol administration.

In the male CLP group, 1259 genes were up-regulated. Landiolol down-regulated 418 genes. A V form was found for 226 genes (Additional file 2). For an overview of their biological activities, significant biological processes were identified and an integrative network was generated using Cytoscape (Fig. 2a). Landiolol reversed genes associated with inflammation, oxidative stress, oxygen-containing compound, and lipopolysaccharide responses, phosphorus metabolic and apoptotic processes, cell death and migration. For example, genes associated with the JAK/STAT pathway, IL6R and STAT, with the PI3K/AKT and focal adhesion pathways, fibroblast growth factor 2 (FGF2) and nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), and with the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) pathways, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responsive element modulator and MAPK14, were back-regulated by landiolol infusion (Fig. 2a). Expression levels of the G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) was also restored almost to the sham group level by landiolol infusion (Fig. 2a). In females, only 12 genes were down-regulated in the CLP plus landiolol group and seven genes displayed a V form (Fig. 2b). None of the genes were associated with significant biological processes. Two genes, Phosphodiesterase 10A (PDE10A) and cAMP-responsive element modulator, were associated with the adrenergic signalling KEGG pathway.

Regarding the CLP down-regulated genes, no associated biological processes were found for genes with a V form either in males or in females. A list of the 247 genes found in males is presented in Additional file 2. The KEGG pathways associated with these DEGs were classified according to the number of genes found in each pathway (Fig. 3). The metabolic pathway was the most represented in males. Other pathways, for example T cell receptor signalling, NOD-like receptor signalling, Wnt signalling, Hippo signalling, adrenergic signalling, cAMP signalling, cGMP-dependant protein kinase G (PKG) signalling and PI3K-Akt signalling, were found only in males (Fig. 3a). For example, genes associated with the JAK/STAT pathway, BCL2 and aldehyde oxidase 3





Discussion

In this study, we identified biological processes and signalling pathways associated with the cardiac response to landiolol in septic male and female rats. This is the first genome-wide analysis of the sex-mediated response to a β -blocker in sepsis-induced myocardial dysfunction. Our results highlight differences between males and females, during sepsis and after landiolol administration. Several biological processes were found only in males. In contrast, effects were limited in females. These results support our previous findings obtained by MRI studies, showing decreased indexed stroke volume (SVi), cardiac index (CI) and indexed end-diastolic volume (EDVi) after CLP in males, whereas only CI and EDVi decreased in females. Landiolol improved cardiac performance in the septic males by increasing SVi. In the septic females, landiolol reduced left ventricular ejection fraction (LVEF) and systolic wall thickening (sWtn). Blood pressure remained constant in males but decreased in females after landiolol [26].

A higher number of deregulated genes were found in males, affecting the inflammatory response, the innate immune response and the gonad development, which were enriched by up-regulated genes. Biological processes enriched by down-regulated genes were the organisation of the extracellular matrix, muscle cell differentiation, muscle tissue development, sarcolemma and T-tubules, muscle and cardiac contraction, contractile fibres and sarcomeres, potassium transmembrane transport, positive regulation of calcium transport and the PI3K/AKT signalling pathway. In summary, inflammatory response, apoptosis, metabolism, oxidative stress and calcium ion transport were down-regulated specifically in males. In females, very few sepsis-induced DEGs and no significant biological processes were detected after landiolol administration.

Our results are in line with findings on the human septic cardiomyopathy. Down-regulation of cardiac mitochondrial genes, in addition to multiple alterations in sarcomeric genes and genes that maintain the structural integrity of the sarcolemma, were described [31]. Matkovich et al. hypothesised that the cardiac response to sepsis was coordinated in a 'programmatic' mode, as described in myocardial hibernation [31].

In male rats, CLP had profound effects on the expression of genes involved in JAK/STAT, PI3K and focal adhesion pathways. Moreover, CLP up-regulated transcripts encoding for p53-dependent cell-cycle arrest (p21 and stromal antigen 1 (STAG1)), toll-like receptor 1 (TLR1) and myeloid differentiation primary response 88 (MyD88). These changes were not described in females. These results support findings of the pronounced myocardial dysfunction in male rats, as compared to female rats [26]. They are in line with data published by Rudiger et al. in which these pathways were associated with poor outcome [17]. An increased systemic inflammatory response through circulating myocardial depressant factors, including nitric oxide (NO), may compromise myocardial function [17]. The level of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), generated by soluble guanylyl cyclase (GC) and regulated by NO, played opposite roles in males and females, being protective in males and deleterious in females [29]. In our model, the endothelial NO synthase (eNOS) protein level was increased [26] and the transcript of the guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2 (GUCY1A2) was decreased in the male CLP group. Interestingly, landiolol reversed the expression of most of the transcripts of the aforementioned signalling pathways and the increase in eNOS expression only in males [26].

Sex-related differences detected in transcript abundance of the β -adrenergic signaling and calcium cycling pathways were associated with reduced survival [17]. These changes may lead to a reduced L-type calcium current [32], and a high cytosolic Ca^{2+} level, leading to failure of diastolic relaxation and low sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} levels, which affect systolic contraction as previously observed in septic cardiomyopathy [33]. A decrease of SERCA3 was found specifically in the male CLP group, corresponding to the significant decrease of the indexed stroke volume in the MRI [26]. Sex differences in the mechanisms of the contractile function and in the response to the β -adrenergic stimulation were previously described [34, 35]. In lipopolysaccharide-induced cardiomyopathy, sarcomere shortening depression occurred with different regulations of cellular calcium transients and SERCA in male and female mice [27]. Deficits in mechanisms downstream of cellular calcium transients, possibly a decrease in myofilament sensitivity for calcium following troponin I hyperphosphorylation [36], can explain this difference. Moreover, oestrogen may modulate the properties of the ryanodine receptor [37] and the interplay between oestrogen receptors and the β -adrenergic receptors could affect Ca^{2+} -handling proteins and the phosphoinositide-3-kinase-AKT (PI3K-AKT) pathway in a sex-dependent manner [38].

Finally, data on sex dimorphism in the response to landiolol during septic cardiomyopathy should be considered in patient studies, in conjunction with an investigation of inflammation attenuation, improved outcome and heart rate control [39–42].

Our study has some limitations. The ex vivo assessment of cardiac function at the end of the protocol might have altered the expression of transcripts. However, the procedure was similar for all the groups and we used a differential analysis to minimise the effect of this procedure. Our results are consistent with those of in vivo studies in which this ex vivo procedure is absent [17], and with those published in humans using the same type of differential analysis [31]. Another limitation is the absence of calculations to determine the sample-size required. However, Allison et al. examined key components of microarray analysis and indicated that, for common designs in which two groups of cases are evaluated for differential expression, a minimum of five biological replicates per group should be analysed [30]. In our study, we had 5–6 biological replicates for each group and chose the 2-class SAM analysis to detect significant variation in gene expression between groups (CLP group vs sham group and CLP plus landiolol group vs CLP group). The number of altered genes does not predict the severity of the organ dysfunction, and changes in gene expression do not necessarily reflect changes in the level of protein expression. Our results need to be confirmed at the protein level. In addition, we focused our transcriptomic analyses on cardiac tissue. However, it is reasonable to speculate that each organ has a specific transcriptomic response to infection, as reported previously for the liver [43]. The timing of each experiment may affect the findings [44]. In our study, changes in gene expression were analysed 20 h after CLP. This can explain differences to previous experiments in which measures were performed at 6 h post-insult [17] and 48 h post-insult [45]. Another limitation is that despite fluid administration at $10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, we cannot rule out hypovolemia related to capillary leak in the CLP animals. Rudiger et al. attenuated the decline in stroke volume and left ventricular end-diastolic volume by the use of fluid resuscitation consisting of a 1:1 solution of 6% hetastarch and an additional 25 ml kg^{-1} body weight of fluid boluses at 6 h and 10 ml kg^{-1} at 24 h [17]. In addition, the response to the opioid

buprenorphine, used for pain control, might have affected gene expression in a sex-dependent manner. Doyle et al. described sex differences in morphine metabolism and associated circulatory cytokines levels [46]. We have established our experimental conditions to prevent septic shock in animals. We did not use antibiotics and no animals died during the experiments. Our results may therefore differ from those obtained in humans or in some animals resuscitated with both fluids and antibiotics. Moreover, most intensive care unit patients receive sedation including opioids [47].

Conclusion

In a CLP-induced animal model of sepsis, the regulation of myocardial transcripts in male rats differed from that in female rats. We found common functional annotations induced by sepsis in both sexes, but many processes associated with the development, differentiation, organisation and function of cardiac muscle cells were deregulated only in males. These results were in agreement with the pathological status of the animals and demonstrated that sepsis-related changes in gene transcription were more pronounced in males than in females. Landiolol had diverse effects on biological processes in male and female rats. After landiolol administration, the expression of genes related to different biological processes was reversed in males. This possibly explains the improvement in the cardiac function of the male animals in the landiolol-treated group. No significant functional annotation was found in females in the landiolol-treated group. Only few genes associated with adrenergic, protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha, calcium and hypertrophic signalisation were differentially expressed and may explain the deleterious effects on cardiac function observed after landiolol in females.

Additional files

Additional file 1: Lists of differentially expressed genes in male and female hearts after cecal ligation and puncture and landiolol. Lists of significantly up- and down-regulated genes, obtained after 2-class SAM, in CLP group vs sham group (FDR < 0,01) and in CLP plus landiolol group vs CLP (FDR < 0,05) in males and females. Common genes between males and females are noted in blue. (XLSX 211 kb)

Additional file 2: Lists of differentially expressed genes with a characteristic V form in male. Lists of the significantly up- and down-regulated genes in sepsis and back-regulated by landiolol infusion in males. (XLSX 41 kb)

Additional file 3: Table S1. GO annotations for differentially expressed genes in male and female hearts after cecal ligation and puncture. Gene ontology analysis realized with the DAVID Database is reported in the table. The most significant biological processes (BP), cellular components (CC) and KEGG-pathways (KEGG) GO terms for up- and down-regulated genes are indicated for CLP vs sham groups in males and females. For all the processes, the number of genes deregulated in males is much greater than in females. *N. of genes = Number of genes; NS = not significant; ∅ = not found.* **Table S2.** GO annotations for differentially expressed genes in male and female hearts after landiolol administration. Gene ontology analysis realized with the DAVID Database is reported in the table. Significant biological processes (BP) and KEGG-pathway (KEGG) GO terms for up- and down-regulated genes are indicated for CLP plus landiolol vs CLP groups in males and females. For all the processes, the number of genes deregulated in males is much greater than in females and significant biological processes were totally absent for females after landiolol infusion. *N. of genes = Number of genes; NS = not significant; ∅ = not found.* (PPTX 51 kb)

Abbreviations

AR: Adrenergic receptor; BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; CI: Cardiac index; CLP: Cecal ligation and puncture; DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; DEG: Differentially expressed gene; EDVi: End-diastolic volume index; FDR: False discovery rate; GRK: G protein-coupled receptor kinase 5; IL: Interleukin; JAK/STAT: Janus kinase/signal transducer and activator of transcription; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MRI: Magnetic resonance imaging; MYH7B: Myosin heavy chain 7B cardiac muscle beta; NO: Nitric oxide; NOS: Nitric oxide synthase; p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha; PI3K-AKT: Phosphoinositide-3-kinase-AKT; PKA: Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha; PP2: Protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha; SAM: Significance analysis of microarrays; SERCA: Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase; SVI: Stroke volume index; TNF-α: Tumour necrosis factor-α; TUBA: Tubulin alpha 8; ΔCai: Cellular calcium transients

Acknowledgments

Transcriptomic experiments were performed at the TGML Platform, supported by grants from INSERM, GIS IBISA, Aix-Marseille Univ and ANR-10-INBS-0009-10.

We are grateful to P. Rihet, L. Spinelli and Y. Labiad for discussions on transcriptomic analysis and A. Bergon for help with computing tools.

Funding

This work was supported by INSERM, CNRS and Aix-Marseille University. TTT is supported by a fellowship from the MESR. MC received funding from Fondation Recherche Médicale (DEA20150633224) and Lions club Marseille Doyen. The landiolol was provided by Amomed. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The microarray datasets generated and analysed during the current study are available in the NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) website with the GEO accession number: GSE125042. All the other datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

Conception of the work: MB, LM and LN. Design of the work: TTT, MC, BM, LM and LN. Acquisition of data: TTT, TM, LB, LLT and LN. Analysis of data: TTT, TM, LB and LN. Interpretation of data: TTT, MC, LM and LN. Drafted the work: TTT, LM and LN. Revision of the work: TTT, MC, TM, NC, BM, LM and LN. Review and approval: TTT, MC, TM, LB, LLT, NC, BM, LM and LN. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All animal procedures were conducted in accordance with national Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals in conformity with the 2010/63 EU directive and with the approval of the Institutional Animal Care Committee of Aix-Marseille University (APAFIS#3746-201601221813985; May 2016).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

LM discloses conflict of interest with Amomed (Consulting, Lectures), Aguetant (Consulting), Aspen (Lecture), MSD (Lecture), Pfizer (Lecture), Orion (Lecture) and Octapharma (Lecture). The other authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Author details

¹Aix-Marseille Univ, INSERM UMR 1090, TAGC, Campus de Luminy, Case 928, 13288 Marseille Cedex 9, France. ²Aix-Marseille Univ, Service d'anesthésie et de réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Chemin des Bourrely, 13015 Marseille, France. ³Aix-Marseille Univ, INSERM UMR 1090, TGML, Marseille, France.

⁴Aix-Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France.

Received: 5 June 2019 Accepted: 5 August 2019

Published online: 19 August 2019

References

1. Martin L, Derwall M, Al Zoubi S, Zechendorf E, Reuter DA, Thiemermann C, Schuerholz T (2019) The Septic Heart: Current Understanding of Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Chest* 155(2):427–37. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.08.1037>
2. Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE (1999) Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Phys* 276:R265–R276
3. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W (1985) A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 76:1539–1553
4. Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H (2015) Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 16: 17763–17778
5. Kumar A, Wood K, Parrillo JE (2003) Circulating substances and energy metabolism in septic shock. *Crit Care Med* 31: 632–633
6. Rudiger A, Singer M (2007) Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 35:1599–1608
7. de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D (2009) Bench-to-bedside review: beta-adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 13:230
8. Rudiger A (2010) Beta-block the septic heart. *Crit Care Med* 38:S608–S612
9. Gore DC, Wolfe RR (2006) Hemodynamic and metabolic effects of selective beta1 adrenergic blockade during sepsis. *Surgery* 139:686–694
10. Morelli A, Ertmer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, Orecchioni A, D'Egidio A, D'Ippoliti F, Raffone C, Venditti M, Guaracino F, Girardis M, Tritapepe L, Pietropaoli P, Mebazaa A, Singer M (2013) Effect of heart rate control

- with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA* 310:1683–1691
11. Schmittinger CA, Dunser MW, Haller M, Ulmer H, Luckner G, Torgersen C, Jochberger S, Hasibeder WR (2008) Combined milrinone and enteral metoprolol therapy in patients with septic myocardial depression. *Crit Care* 12:R99
12. Aboab J, Sebillé V, Jourdain M, Mangalaboyi J, Gharbi M, Mansart A, Annane D (2011) Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock. *Intensive Care Med* 37: 1344–1351
13. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, Singer M, Gourine AV (2010) Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 38:388–394
14. Hagiwara S, Iwasaka H, Maeda H, Noguchi T (2009) Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock* 31:515–520
15. Kimmoun A, Louis H, Al Kattani N, Delemazure J, Dessales N, Wei C, Marie PY, Issa K, Levy B (2015) beta1-adrenergic inhibition improves cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Crit Care Med* 43:e332–e340
16. Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J (2005) Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* 33:2294–2301
17. Rudiger A, Dyson A, Felsmann K, Carre JE, Taylor V, Hughes S, Clatworthy I, Protti A, Pellerin D, Lemm J, Claus RA, Bauer M, Singer M (2013) Early functional and transcriptomic changes in the myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)* 124:391–401
18. Leinwand LA (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 112:302–307
19. Theuring F, Neumann B, Scheler C, Jungblut PR, Schwab K (2018) Sex differences in murine myocardium are not exclusively regulated by gonadal hormones. *J Proteome* 178:43–56
20. Hart EC, Charkoudian N, Wallin BG, Curry TB, Eisenach J, Joyner MJ (2011) Sex and ageing differences in resting arterial pressure regulation: the role of the beta-adrenergic receptors. *J Physiol* 589:5285–5297
21. Neale BJ, Chowiecnyk PJ, Brett SE, Coltart DJ, Ritter JM (2000) Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. *J Am Coll Cardiol* 36:1233–1238
22. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH (2014) Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5:12–19
23. Leone M, Honstetter A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, Mege JL (2004) Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. *J Infect Dis* 189:339–345
24. Textoris J, Ban LH, Capo C, Raoult D, Leone M, Mege JL (2010) Sex-related differences in gene expression following *Coxiella burnetii* infection in mice: potential role of circadian rhythm. *PLoS One* 5:e12190
25. Zhu H, Shan L, Peng T (2009) Rac1 mediates sex difference in cardiac tumor necrosis factor-alpha expression via NADPH oxidase-ERK1/2/p38 MAPK pathway in endotoxemia. *J Mol Cell Cardiol* 47:264–274
26. Mathieu C, Desrois M, Kober F, Lavee N, Lan C, Fourny N, Iche-Torres M, Tran TT, Le LT, Singer M, Mege JL, Bernard M, Leone M (2018) Sex-mediated response to the beta-blocker landiolol in sepsis: an experimental, randomized study. *Crit Care Med* 46:e684–e691
27. Hobai IA, Buys ES, Morse JC, Edgecomb J, Weiss EH, Armondas AA, Hou X, Khandelwal AR, Siwik DA, Brouckaert P, Cohen RA, Colucci WS (2013) SERCA Cys674 sulphonylation and inhibition of L-type Ca²⁺ influx contribute to cardiac dysfunction in endotoxemic mice, independent of cGMP synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305: H1189–H1200
28. Turdi S, Han X, Huff AF, Roe ND, Hu N, Gao F, Ren J (2012) Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Free Radic Biol Med* 53:1327–1338
29. Hobai IA, Aziz K, Buys ES, Brouckaert P, Siwik DA, Colucci WS (2016) Distinct myocardial mechanisms underlie cardiac dysfunction in endotoxemic male and female mice. *Shock* 46:713–722
30. Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M (2006) Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* 7:55–65
31. Matkovich SJ, Al Khiami B, Efimov IR, Evans S, Vader J, Jain A, Brownstein BH, Hotchkiss RS, Mann DL (2017) Widespread down-regulation of cardiac mitochondrial and Sarcomeric genes in patients with Sepsis. *Crit Care Med* 45:407–414
32. Stengl M, Bartak F, Sykora R, Chvojka J, Benes J, Krouzecky A, Novak I, Sviglerova J, Kuncova J, Matejovic M (2010) Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* 38: 579–587
33. Duncan DJ, Yang Z, Hopkins PM, Steele DS, Harrison SM (2010) TNF-alpha and IL-1beta increase Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* 47:378–386
34. Schwartz DW, Vizgirda V, Solaro RJ, Piano MR, Ryjewski C (1999) Sexual dimorphism in rat left atrial function and response to adrenergic stimulation. *Mol Cell Biochem* 200:143–153
35. Vizgirda VM, Wahler GM, Sondgeroth KL, Ziolo MT, Schwartz DW (2002) Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H256–H263
36. Layland J, Cave AC, Warren C, Grieve DJ, Sparks E, Kentish JC, Solaro RJ, Shah AM (2005) Protection against endotoxemia-induced contractile dysfunction in mice with cardiac-specific expression of slow skeletal troponin I. *FASEB J* 19:1137–1139
37. Levy RJ, Deutschman CS (2004) Evaluating myocardial depression in sepsis. *Shock* 22:1–10
38. Machuki JO, Zhang HY, Harding SE, Sun H (2018) Molecular pathways of oestrogen receptors and β -adrenergic receptors in cardiac cells: Recognition of their similarities, interactions and therapeutic value. *Acta Physiol (Oxf)* 222(2). <https://doi.org/10.1111/apha.12978>
39. Okajima M, Takamura M, Taniguchi T (2015) Landiolol, an ultra-short-acting beta1-blocker, is useful for managing supraventricular tachyarrhythmias in sepsis. *World J Crit Care Med* 4:251–257
40. Rehberg S, Joannidis M, Whitehouse T, Morelli A (2018) Landiolol for managing atrial fibrillation in intensive care. *Eur Heart J Suppl* 20:A15–A18
41. Tochikubo J, Adachi YU, Ejima T, Numaguchi A, Matsuda N, Sato S, Shiya N (2014) Landiolol reduces hemodynamic responses to bronchoscopy-assisted suctioning in intubated ICU patients. *J Intensive Care* 2:6

42. Unger M, Morelli A, Singer M, Radermacher P, Rehberg S, Trimmel H, Joannidis M, Heinz G, Cerny V, Dostal P, Siebers C, Guarracino F, Pratesi F, Biancofiore G, Girardis M, Kadlecova P, Bouvet O, Zorer M, Grohmann-Izay B, Krejcy K, Klade C, Krüml G (2018) Landiolol in patients with septic shock resident in an intensive care unit (LANDI-SEP): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 19:637
43. Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carre JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M (2012) Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med* 9:e1001338
44. Lesur I, Textoris J, Llorid B, Courbon C, Garcia S, Leone M, Nguyen C (2010) Gene expression profiles characterize inflammation stages in the acute lung injury in mice. *PLoS One* 5:e11485
45. dos Santos CC, Gattas DJ, Tsoporis JN, Smeding L, Kabir G, Masoom H, Akram A, Plotz F, Slutsky AS, Husain M, Sibbald WJ, Parker TG (2010) Sepsis-induced myocardial depression is associated with transcriptional changes in energy metabolism and contractile related genes: a physiological and gene expression-based approach. *Crit Care Med* 38:894–902
46. Doyle HH, Murphy AZ (2018) Sex-dependent influences of morphine and its metabolites on pain sensitivity in the rat. *Physiol Behav* 187:32–41
47. Woien H, Stubhaug A, Bjork IT (2012) Analgesia and sedation of mechanically ventilated patients—a national survey of clinical practice. *Acta Anaesthesiol Scand* 56:23–29

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

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

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

Category	GO terms	Males		Females	
		N. of genes	Benjamini	N. of genes	Benjamini
Up-regulated genes					
BP	GO:0006954~inflammatory response	74	1,97E-12	34	4,33 E-05
BP	GO:0050729~positive regulation of inflammatory response	18	6,29E-04	5	NS
BP	GO:0002526~acute inflammatory response	25	2,44E-06	12	7,20E-03
BP	GO:0002544~chronic inflammatory response	8	7,45 E -03	ø	ø
BP	GO:0032496~response to lipopolysaccharide	53	9,54E-09	23	2,83E-03
BP	GO:0009617~response to bacterium	67	6,35E-08	29	5,80E-03
BP	GO:0034097~response to cytokine	73	1,81E-07	35	1,10E-03
BP	GO:0034612~response to tumor necrosis factor	24	2,22E-03	15	5,50E-03
BP	GO:0046651~lymphocyte proliferation	34	3,94E-05	13	NS
BP	GO:0006955~immune response	96	9,55E-07	41	0,02
BP	GO:0045087~innate immune response	48	7,47E-04	22	NS
BP	GO:0006915~apoptotic process	125	1,14E-06	65	8,11E-05
BP	GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	53	2,34E-04	25	0,03
BP	GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	66	1,63E-03	36	5,70E-03
BP	GO:0033002~muscle cell proliferation	27	5,47E-05	13	0,02
BP	GO:0051246~regulation of protein metabolic process	174	4,06E-07	81	1,60E-03
BP	GO:0051248~negative regulation of protein metabolic process	78	4,32E-04	38	0,02
BP	GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	106	7,73E-05	49	0,02
BP	GO:0045859~regulation of protein kinase activity	52	4,43 E-03	32	1,76E-03
BP	GO:0034599~cellular response to oxidative stress	27	0,01	16	0,02
BP	GO:0045137~development of primary sexual characteristics	32	5,74E-04	16	0,03
BP	GO:0008406~gonad development	31	9,54E-04	15	NS
Down-regulated genes					
CC	GO:0005739~mitochondrion	170	1,64E-05	112	3,33E-13
BP	GO:0030198~extracellular matrix organization	37	7,65E-06	16	NS
BP	GO:0042692~muscle cell differentiation	43	1,32 E-02	22	NS
BP	GO:0060537~muscle tissue development	44	1,65 E-02	22	NS
BP	GO:0061061~muscle structure development	66	1,25 E-03	ø	ø
CC	GO:0042383~sarcolemma	28	1,92E-04	13	NS
CC	GO:0030315~T-tubule	13	1,20 E-02	6	NS
BP	GO:0060047~heart contraction	25	1,42 E-02	14	NS
BP	GO:0006936~muscle contraction	32	1,96 E-02	21	0,03
BP	GO:0008015~blood circulation	46	2,38 E-02	30	0,02
BP	GO:0060048~cardiac muscle contraction	16	2,71 E-02	9	NS
CC	GO:0043292~contractile fiber	31	5,00E-03	15	NS
CC	GO:0030016~myofibril	30	5,77E-03	ø	ø
CC	GO:0030017~sarcomere	24	4,46 E-02	13	NS
BP	GO:0006811~ion transport	115	0,02	72	6,4 E-03
BP	GO:0071805~potassium ion transmembrane transport	28	8,50E-04	13	NS
BP	GO:0090279~regulation of calcium ion import	18	0,02	14	0,01
BP	GO:0051928~positive regulation of calcium ion transport	19	1,49 E-02	12	NS
KEGG	rno04510:Focal adhesion	30	9,42E-04	17	0,01
KEGG	rno04151:PI3K-Akt signaling pathway	37	8,00E-03	21	NS

Supplemental Table 1

Category	GO Terms	Males		Females	
		N. of genes	Benjamini	N. of genes	Benjamini
Up-regulated genes					
BP	GO:0006955~immune response	56	2,24E-04	ø	ø
BP	GO:0046651~lymphocyte proliferation	19	1,16 E-02	ø	ø
BP	GO:0030036~actin cytoskeleton organization	29	9,36 E-03	ø	ø
BP	GO:0007010~cytoskeleton organization	46	1,54 E-02	4	NS
BP	GO:0045595~regulation of cell differentiation	99	1,18 E-05	11	NS
BP	GO:0016310~phosphorylation	119	5,47E-04	12	NS
BP	GO:0016311~dephosphorylation	26	4,25 E-05	4	NS
BP	GO:0060402~calcium ion transport into cytosol	13	1,27E-02	ø	ø
Down-regulated genes					
BP	GO:0070887~cellular response to chemical stimulus	146	5,78E-05	19	NS
BP	GO:0006954~inflammatory response	21	4,05 E-02	ø	ø
BP	GO:0008219~cell death	65	5,40 E-07	12	NS
BP	GO:0006915~apoptotic process	56	9,86E-06	11	NS
BP	GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	25	2,00 E-03	ø	ø
BP	GO:0008283~cell proliferation	49	7,88 E-03	3	NS
BP	GO:0007155~cell adhesion	93	9,24E-05	ø	ø
BP	GO:0006979~response to oxidative stress	19	2,90 E-02	ø	ø
BP	GO:0051246~regulation of protein metabolic process	63	4,45 E-05	16	NS
BP	GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	43	5,04 E-05	10	NS
BP	GO:0033993~response to lipid	36	1,10 E-02	4	NS
BP	GO:0040008~regulation of growth	23	3,38 E-02	4	NS
KEGG	rno04010:MAPK signaling pathway	16	3,04 E-05	ø	ø

Supplemental Table 2

Table S1. GO annotations for differentially expressed genes in male and female hearts after cecal ligation and puncture. Gene ontology analysis realized with the DAVID Database is reported in the table. The most significant biological processes (BP), cellular components (CC) and KEGG-pathways (KEGG) GO terms for up- and down-regulated genes are indicated for CLP vs sham groups in males and females. For all the processes, the number of genes deregulated in males is much greater than in females. *N. of genes = Number of genes; NS = not significant; ø = not found.* **Table S2.** GO annotations for differentially expressed genes in male and female hearts after landiolol administration. Gene ontology analysis realized with the DAVID Database is reported in the table. Significant biological processes (BP) and KEGG-pathway (KEGG) GO terms for up- and down-regulated genes are indicated for CLP plus landiolol vs CLP groups in males and females. For all the processes, the number of genes deregulated in males is much greater than in females and significant biological processes were totally absent for females after landiolol infusion. *N. of genes = Number of genes; NS = not significant; ø = not found.* (PPTX 51 kb)

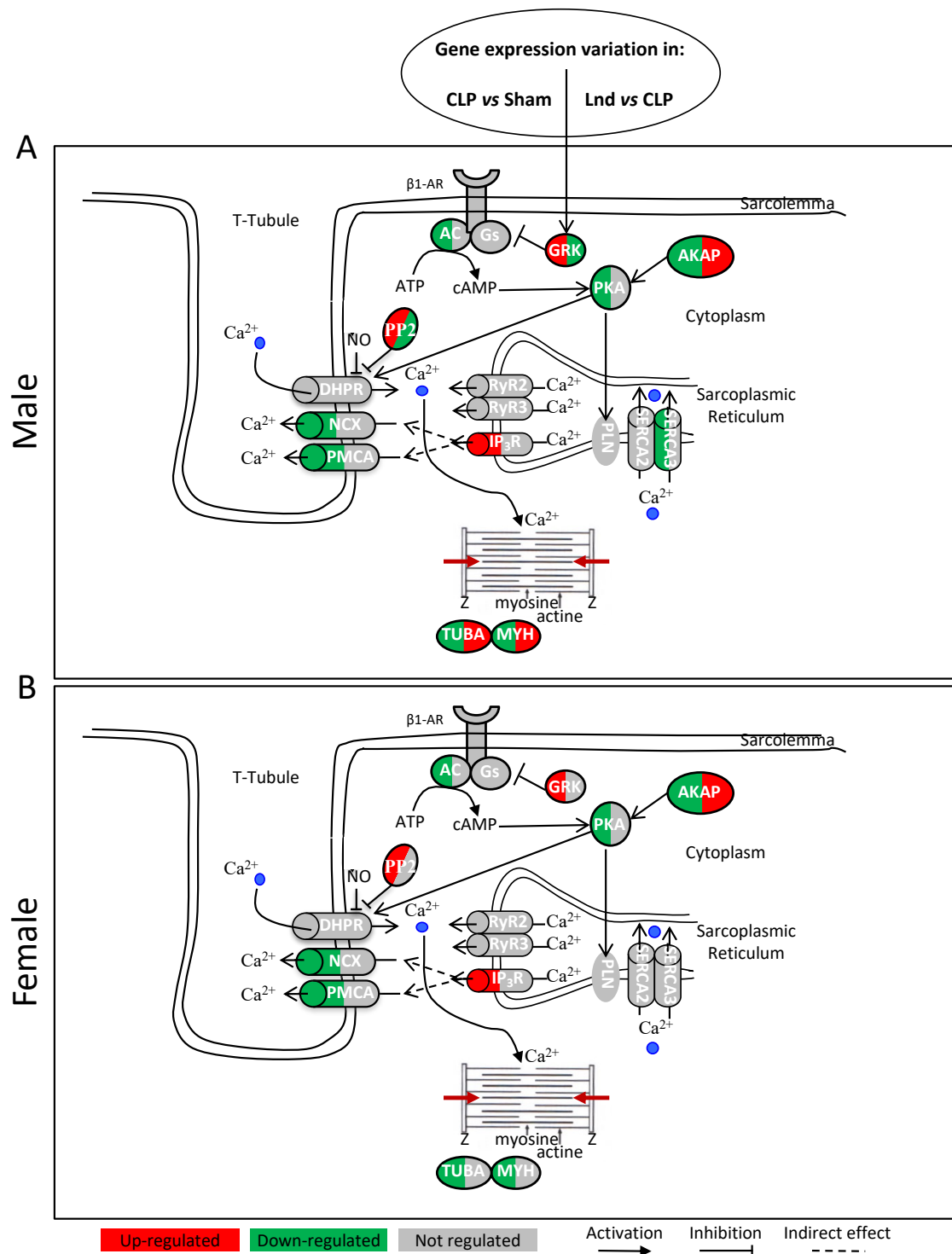


Figure 21 : La voie $\beta 1$ -adrénergique dans les cœurs mâles et femelles après ligature et ponction caecale (CLP) et landiolol (Lnd). Synthèse de la régulation de l'expression du gène associée à la voie $\beta 1$ -adrénergique chez les mâles (A) et les femelles (B) 20h après induction du CLP (SAM 2 classes, 10 000 permutations avec $FDR < 0.01$ ou 0.05). A noter que le gène du réticulum sarcoplasmique SERCA3 n'a été perturbé pendant la CLP que chez les mâles, tout comme PP2, GRK5 et les protéines contractiles TUBA8 et MYH7B après perfusion du Lnd.

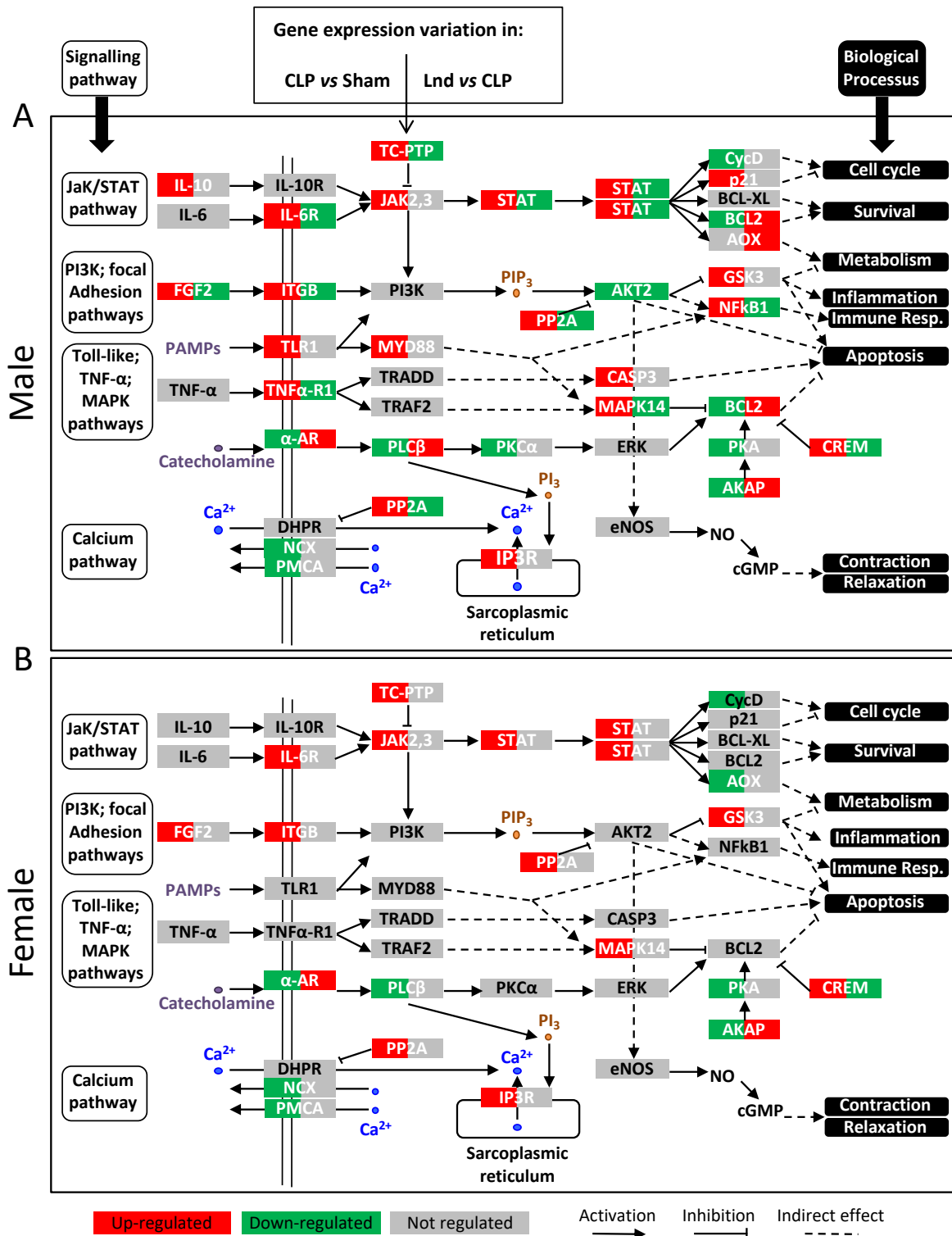


Figure 22 : Voies de signalisation dans les cœurs mâles et femelles après ligature et ponction caecale (CLP) et landiolol (Lnd). Synthèse de la régulation de l'expression du gène associée à différentes voies de signalisation (rectangles à gauche) chez les mâles (A) et les femelles (B) 20h après induction de CLP (SAM 2 classes, 10 000 permutations avec FDR < 0.01 ou 0.05). A noter que la régulation de l'expression d'IL-10, TLR1, MYD88, TNFα-R1, PKCα, CASP3, AKT2, p21, BCL2 et NF-κB1 était différemment régulée après CLP selon le sexe ainsi que celle d'IL-10, FGF2, IL-6R, ITGB, TNFα-R1, TC-PTP, PCLβ, PP2A, STAT, AKT2, CASP3, p21, BCL2 et NF-κB1 après perfusion de Lnd. Ces différences importantes contribuent à la dérégulation des processus biologiques illustrés à droite sur la figure.

2.3. Synthèse de l'article 2

Dans cette analyse, nous avons remarqué que les processus biologiques n'étaient pas différents entre mâles et femelles septiques mais que le nombre de gènes dérégulés dans chacun de ces processus était beaucoup plus important chez le mâle. Parmi ces processus, nous avons trouvé une dérégulation positive des voies de l'immunité, de l'inflammation, de l'apoptose, du stress oxydatif et du métabolisme. Inversement, les fonctions mitochondriales et cardiovasculaires, le transport des ions et la différenciation cardiaque étaient fortement diminués. Le fait que le nombre de gènes dérégulés dans chacun de ces processus était plus important chez le mâle corrobore le sepsis plus sévère qu'on avait observé. Après traitement par le landiolol, excepté les voies de l'immunité qui sont potentialisées, l'ensemble des processus cités ci-dessus est inversé chez le mâle, ce qui confirme l'effet bénéfique du landiolol observé sur la fonction cardiaque en IRM. Chez la femelle, seule une centaine de gènes était dérégulée et nous n'avons retrouvé aucun processus biologique associé à cette faible régulation. En conclusion, l'utilisation des β -bloquants pendant le sepsis semble bénéfique pour traiter la dysfonction cardiaque uniquement chez le mâle.

3. Étude 3

3.1. Contexte de l'étude 3

Différentes études, dont les nôtres, montrent que le sexe influence le pronostic et la survie dans le sepsis et le choc septique par l'intermédiaire d'une modulation des réponses immunitaires et cardiovasculaires. Cette modulation semble donc être liée à l'action des hormones sexuelles, avec un effet plutôt délétère des hormones sexuelles masculines et un effet protecteur des hormones sexuelles féminines sur la réponse immunitaire. Les hormones sexuelles influencent également la réponse cardiovasculaire, et un effet protecteur des hormones sexuelles féminines a été mis en évidence dans des modèles de dysfonction myocardique inflammatoire tel qu'un choc hémorragique ou une ischémie myocardique (Mahmood et al., 2012 ; Wang et al., 2006; Zhu et al., 2009). Le rôle exact des hormones sexuelles lors de la dysfonction myocardique est cependant encore mal compris et peu étudié. Nous avons choisi de poursuivre nos travaux dans des rates adultes ovariectomisées (OVR), soumises à la CLP et traitées au landiolol. Dans cette étude, la fonction cardiaque a été évaluée par cinéIRM par nos collaborateurs et je me suis particulièrement intéressée à l'analyse moléculaire (qPCR, western, marqueurs sanguins).

3.2. Article 3

Cette troisième étude fait l'objet d'un article, dans lequel je suis co-auteure, accepté pour publication dans *Scientific reports*.

Main Title: Female hormones prevent sepsis-induced cardiac dysfunction: an experimental randomized study

Alexandre Xerri*, MD^{1,2}; Frédéric Gallardo, MSc³; Frank Kober, PhD²; Calypso Mathieu, MD¹; Natacha Fourny, MSc²; Thi Thom Tran, MSc³; Jean-Louis Mege, PhD⁵; Mervyn Singer, FRCP⁶; Nathalie Lalevée, PhD^{3,4}; Monique Bernard, PhD²; Marc Leone, PhD¹

¹Aix-Marseille Univ, Service d'anesthésie et de réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Chemin des Bourrely, 13015 Marseille, France.

²Aix-Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France

³Aix-Marseille Univ, INSERM, TAGC, UMR S1090, Marseille, France and ⁴CNRS, Marseille, France

⁵Aix-Marseille Univ, Laboratoire d'Immunologie, Hôpital de la Conception, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, 147 boulevard Baille 13385 Marseille, France

⁶ University College London, 4919, Bloomsbury Institute of Intensive Care Medicine, London, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland

***Corresponding author:** Alexandre Xerri; Address: Service d'anesthésie et de réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Chemin des Bourrely, 13015 Marseille, France; Phone: 0625611710; Email: alexandre.xerri@ap-hm.fr

ABSTRACT

Introduction: Although epidemiologic research has demonstrated significant differences in incidence and outcomes of sepsis according to sex, their underlying biological mechanisms are poorly understood. Here, we studied the influence of hormonal status by comparing in vivo cardiac performances measured by MRI in non-ovariectomized and ovariectomized septic female rats.

Methods: Control and ovariectomized rats were randomly allocated to the following groups: sham, sepsis and sepsis plus landiolol. Sepsis was induced by caecum ligation and puncture (CLP). Landiolol, a short-acting selective β 1-adrenergic blocker improving the in vivo cardiac performance of septic male rats was perfused continuously after sepsis induction.. Cardiac MRI was carried out 18 hours after induction of sepsis to assess in vivo cardiac function. Capillary permeability was evaluated by Evans Blue administration and measurement of its tissue extravasation. Variation in myocardial gene and protein expression was also assessed by qPCR and western-blot in the left ventricular tissue.

Results: Sepsis reduced indexed stroke volume, cardiac index and indexed end-diastolic volume compared to sham group in ovariectomized females whereas it had no effect in control females. This was associated with an overexpression of JAK2 expression and STAT3 phosphorylation on Ser727 site, and an inhibition of the adrenergic pathways in OVR females. Landiolol increased the indexed stroke volume by reversing the indexed end-diastolic volume reduction after sepsis in ovariectomized females, while it decreased indexed stroke volume and cardiac index in control. This was supported by an overexpression of genes involved in calcium influx in OVR females while an inactivation of the β -adrenergic and a calcium efflux pathway was observed in control females.

46 **Conclusions:** Sepsis decreased in vivo cardiac performances in ovariectomized females but
47 not in control females, presumably associated with a more pronounced inflammation,
48 inhibition of the adrenergic pathway and calcium efflux defects. Administration of landiolol
49 prevents this cardiac dysfunction in ovariectomized females with a probable activation of
50 calcium influx, while it has deleterious effects in control females in which calcium efflux
51 pathways were down-regulated.

52 **Key words:** Septic shock; septic cardiopathy; ovariectomy; beta-blocker; landiolol

INTRODUCTION

Epidemiological studies have shown that both incidence and outcome of sepsis differ according to sex, with a protective effect of female (1–3, 5, 6). Interestingly, this difference of outcome was not found in old patients, which suggests an influence of hormonal status (2).

This influence is exerted in particular at the cardiovascular level. In a murine model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP), Chen et al. have previously described a sex dimorphism of the septic cardiac dysfunction (7). Our team showed in vivo that female sex was protective for cardiac dysfunction using a model of rat undergoing CLP (8).

Hence, there is an overall accumulation of clues suggesting a crucial role of the hormonal status in the control of sepsis-related cardiovascular dysfunction, as it is in other experimental models of cardiovascular dysfunction like trauma-hemorrhage and myocardial ischemia-reperfusion (9, 10). This prompted us to investigate the effect of ovariectomy on the cardiovascular response to sepsis.

In our previous study, we evaluated the influence of sex on the response to a promising treatment in sepsis, the landiolol, a short-acting selective β_1 -adrenergic blocker. Administration of landiolol improved the in vivo cardiac performance of septic male rats, whereas deleterious effects were found in female rats (8).

We thus compared in vivo cardiac performances measured by MRI in control and ovariectomized septic female rats, treated by landiolol. Capillary permeability was also evaluated by Evans Blue administration and measurement of its tissue extravasation. Finally, cardiac gene and protein expression was investigated in the left ventricular tissue.

METHODS

Animals and surgical procedures

Female Wistar rats (8-9-week-old, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) were housed for a 5-7-day acclimatization period in a temperature and light controlled room with free access to water and food. All animal procedures were conducted in accordance with the National Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals in conformity with the 2010/63 EU directive and with the approval of the Institutional Animal Care Committee of Aix-Marseille University (APAFIS number 17814-2019012215408140). Bilateral ovariectomy procedure is reported in the supplemental data. Anaesthetic and CLP procedures were performed as previously described (8).

Experimental Protocol

Figure 1 summarizes the experimental protocol. Ovariectomized (OVR) and control female rats were randomized to undergo a control laparotomy or the induction of sepsis by caecum ligation and puncture (CLP). A delay of 3 to 4 weeks after the ovariectomy was respected. One hour after CLP, they were again randomized to receive landiolol (AOP Orphan, Vienna, Austria) diluted in n-saline and infused at 0.1mg/kg/min or n-saline (0.8 mL/kg/hr). The infusion volume was similar in all groups. Six groups were assessed: sham (n=7), sepsis (n=8), sepsis plus landiolol (n=7), OVR-sham (n=7), OVR-sepsis (n= 6), and OVR-sepsis plus landiolol (n= 7). Eighteen hours after CLP, female rats were anesthetized using 1.8-2% isoflurane. The caudal ventral artery was cannulated (24-gauge catheter) for blood pressure recording (TruWave pressure; Edwards Lifesciences, Irvine, CA). Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR) were recorded at H18. Body weight variations between H0 and H18 were measured. Cardiac MRI was performed 18 hours after CLP to assess the in vivo cardiac function (cine-MRI). Immediately after cardiac MRI, 2 mL/kg of 4% Evans Blue (EB) solution were injected to female rats. After 30 min, lungs were removed for subsequent measurement of EB tissue

concentration, and hearts were frozen for subsequent quantification of gene and protein expression. The number of rats used for each part of the protocol are detailed in the supplemental data (Supplementary Figure 1).

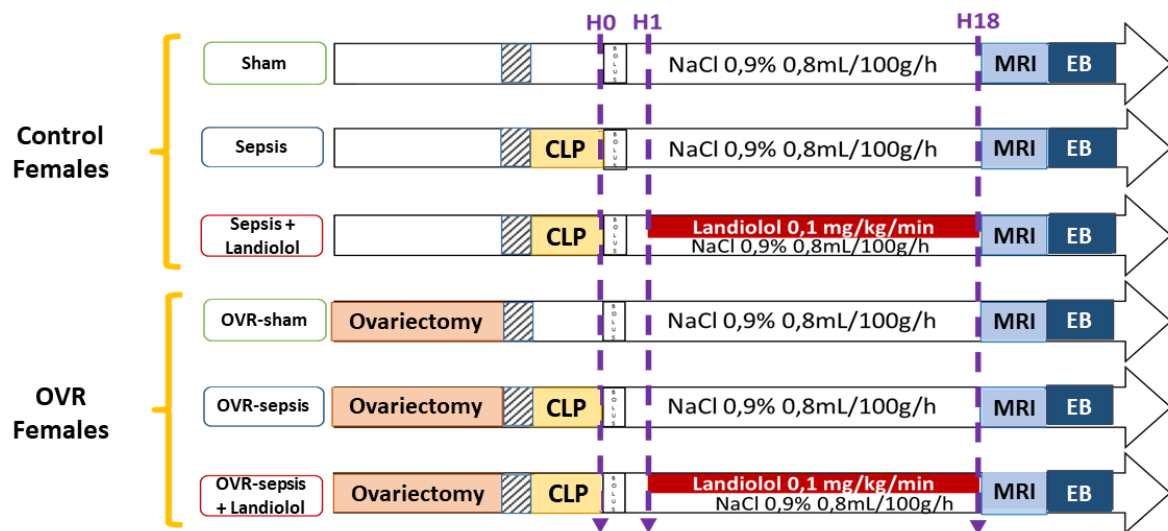


Figure 1: Experimental protocol. OVR: Bilateral ovariectomy CLP: Caecum ligation and puncture. Bolus: NaCl 0,9% 1mL/100g/h in 30 minutes. MRI: Magnetic Resonance Imaging. EB: Injection of 80mg/kg of Evans Blue

MRI Assessment of *In Vivo* Cardiac Function

MRI was performed 18 hours after CLP, immediately after arterial cannulation. During MRI, inhalation anaesthesia was maintained with 1.5-2% isoflurane in 1.5 L/min oxygen continuously delivered through a face mask as previously described(8). Details are provided in the supplemental data.

End-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV), stroke volume (SV), left ventricle ejection fraction (LVEF), left ventricular mass (LVM), mean wall thicknesses in diastole and systole, and systolic wall thickening (WTn) were calculated from the volume measurements, as previously described (11). Cardiac output (CO) was calculated as $CO = HR \times SV$. EDV

(indexed EDV (EDVi)), ESV (indexed ESV (ESVi)), SV (indexed SV (SVi)), and CI were indexed to weight. Image analyses were performed using a home-made program running in IDL environment.

***In vivo* assessment of vascular permeability**

Immediately after cardiac MRI, 2 mL/kg of 4% EB solution was injected to female rats, corresponding to a dose of 80 mg/kg of EB. This was calculated so that all injected EB is bound to albumin (12). Female rats were maintained 30 minutes under anaesthesia to insure a distribution of EB to the vascular system. At 30 min, female rats were euthanized by 100 mg/kg of phenobarbital. Medial laparotomy was then performed, and the abdominal aorta was severed just below the renal arteries. Twenty millilitres of phosphate buffered saline at 4°C were injected in the jugular vein to wash the blood and remaining EB from the vascular system. After bilateral thoracotomy cranial pulmonary lobe were removed for analysis.

Removed tissues were incubated 48 hours at 55°C with 4 mL/g of wet tissue of formamide, in order to extract the EB from the tissue. The EB/formamide mixtures were then centrifuged for 15 min at 4000 rpm. Supernatant was collected and absorbance at 610 nm was measured. Extravasated EB concentration per mg tissue was calculated.

Plasma samples

Blood samples were collected through the jugular vein before CLP and through arterial catheter after cardiac-MRI but before EB injection, centrifuged (2,000 g, 12 min, 4°C), and the resulting plasma aliquoted and stored at –80°C until biochemical analysis.

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Hearts, removed immediately after euthanasia, were dissected, frozen and stored at –80°C until analyses. Total RNA was isolated from the left ventricles and qPCR experiments were

performed as previously described (13). Primers used for transcripts detection are listed in supplemental table 1.

Protein Extraction and Western-blot assay

Lysates were prepared from frozen LVs with Precellys lysing kit (Bertin Technologies) in lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 25 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 μ M ZnCl₂, 1 mM sodium orthovanadate) containing 4% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). After centrifugation (14 000 rpm, 4 °C, 30 minutes), lysates were collected and quantified with Q-Bit protein assay (Thermo). Protein extracts were denatured in SDS loading buffer supplemented with DTT. For each sample, 50 μ g total protein was separated by NuPAGE® Bis-Tris gels (4-12%) (Invitrogen) electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane using the iBlot2® gel transfer system (Life Technologies). Membranes were blocked in 5% skim milk dissolved in Tris-buffered saline (TBS) then incubated overnight at 4 °C in TBS with 5% BSA with antibodies: Jak2 (3230, 1/500), phosphorylated-Stat3 (Tyr705) (9145, 1/2000) and phosphorylated-Stat3 (Ser727) (9134, 1/500) and actin (4968, 1/1000) (all from Cell Signaling). The blots were washed then incubated with HRP-conjugated secondary antibodies. The protein bands were detected using the enhanced chemiluminescence reagent (ECL Prime Western Blotting System, Cytiva) and visualized using the iBright CL750 Imaging System (Thermo). Signal analysis was performed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Statistical Analyses

Data are expressed as means $\pm$ SEM. After statistical evaluation, the number of rats required was 6 per group to show a 30% increase in SV by landiolol with a power of 80% and an alpha risk of 5%. Significant differences between groups were determined using two-way analysis

of variance followed by Sidak post hoc testing with GraphPad Prism software (GraphPad Prism 7.03, La Jolla, CA). A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

General effect of ovariectomy

OVR females had an increased weight gain compared to control ($p < 0.001$ for sham groups; $p < 0.05$ for sepsis groups and $p < 0.01$ for sepsis plus landiolol groups) (Table 1). Body temperature and hemodynamic variables were similar in all groups.

After weight indexing, cardiac variables assessed by MRI were unchanged between OVR and control females (Figure 2). There were no differences of left ventricular mass between OVR and control females of corresponding groups.

No significant differences were found in EB concentrations in lung tissue between OVR and control females of corresponding groups. There were no differences in lactate and procalcitonin plasma concentrations as well (Table 2).

Effects of sepsis on cardiac function in OVR females

Sepsis did not affect the weight, respiratory rate and body temperature at H18. In control females, hemodynamic variables were similar after the sepsis procedure. In OVR females, sepsis decreased systolic blood pressure ($p < 0.05$), as compared with sham (Table 1).

Sepsis did not affect the cardiac performances in control females; no differences in cardiac index (CI), indexed stroke volume (SVi), and indexed end diastolic volume (EDVi) were

Table 1: Physiological and hemodynamic parameters 18 hrs after CLP

Measured parameters	Control			OVR		
	sham (n=6)	sepsis (n=5)	sepsis + Landiolol (n=5)	sham (n=6)	sepsis (n=6)	sepsis + Landiolol (n=6)
Age (weeks)	11.2 ± 0.4	11.6 ± 0.9	11.7 ± 1.2	12.3 ± 1.4	12.2 ± 1	12.2 ± 1.2
Initial weight (g)	183 ± 16	196 ± 20	203 ± 18	191 ± 17	185 ± 26	198 ± 26
Δ weight post-OVR (g)	38 ± 12	42 ± 12	48 ± 29	96 ± 16 ^{†††}	81 ± 11 [†]	99 ± 28 ^{††}
Δ weight post-CLP (g)	11 ± 8	16 ± 5	19 ± 8	19 ± 7	20 ± 5	10 ± 4
RR (cycles/min)	50 ± 3	56 ± 8	53 ± 9	55 ± 12	56 ± 12	61 ± 13
Temperature (°C)	35.9 ± 0.4	35.6 ± 0.4	34.5 ± 1.4	35.8 ± 0.4	35.1 ± 0.5	35.5 ± 1.3
SBP (mmHg)	126 ± 6	113 ± 3	92 ± 16 ^{**}	126 ± 12	94 ± 12 [*]	102 ± 25
DBP (mmHg)	90 ± 9	77 ± 17	59 ± 18	84 ± 9	68 ± 5	69 ± 21
MBP (mmHg)	102 ± 6	89 ± 12	70 ± 17 ^{**}	98 ± 9	77 ± 7	80 ± 21
HR (bpm/min)	389 ± 37	397 ± 24	358 ± 31	382 ± 25	389 ± 52	357 ± 38

187 **Age:** age at the time of CLP; **Δ weight post-OVR:** weight difference between OVR and CLP
188 procedures; **Δ weight post-CLP:** weight difference between CLP and 18 hours after; **RR:**
189 Respiratory rate. **SBP:** Systolic blood pressure; **DBP:** Diastolic blood pressure; **MBP:** Mean
190 blood pressure; **HR:** Heart rate. Data are expressed as means ± SD.

191 [†] p<0.05; ^{††} p<0.01; ^{†††} p<0.001 vs control of corresponding group.

192 ^{*} p<0.05; ^{**} p<0.01 vs control sham and vs OVR-sham, respectively.

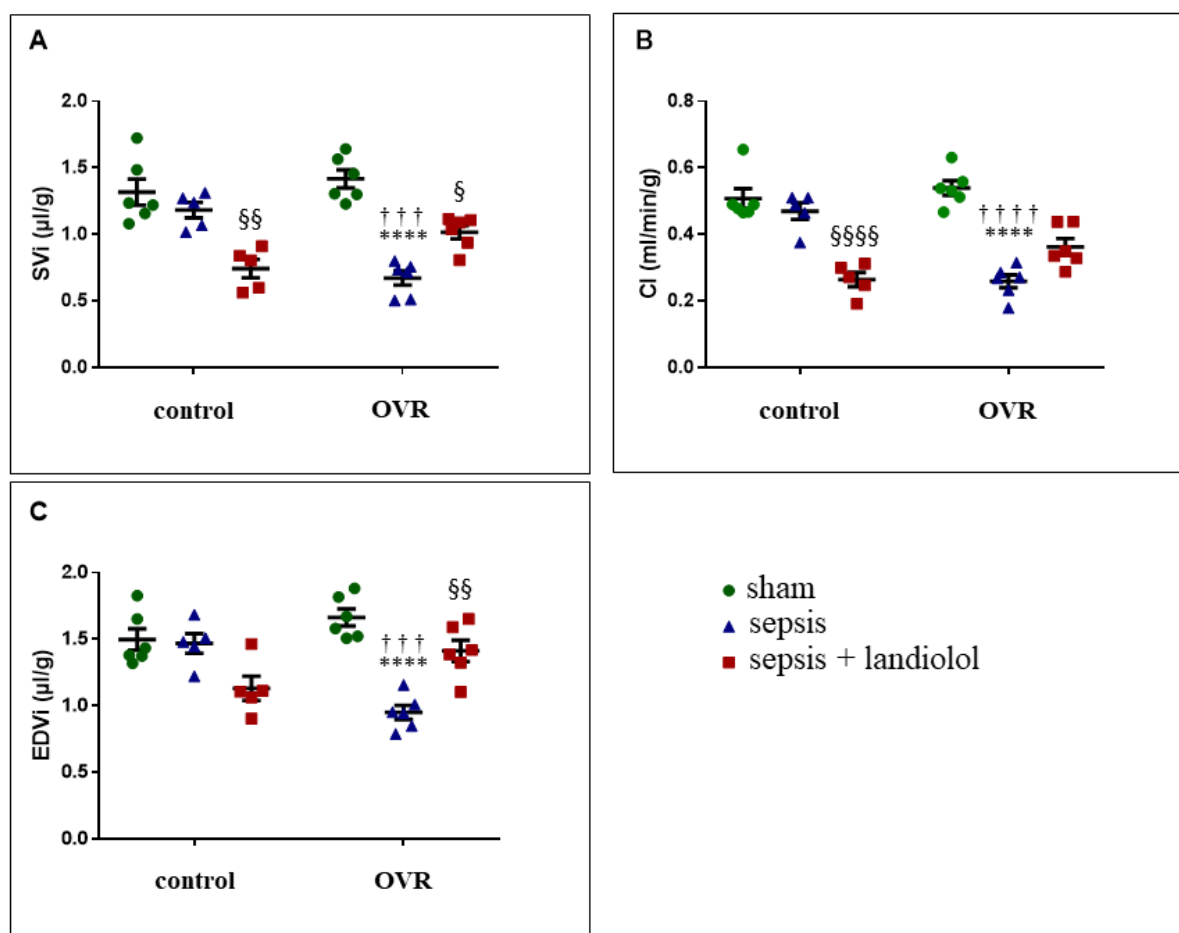


Figure 2: Left ventricular cardiac parameters assessed by MRI of sham (n=6), sepsis (n=5), sepsis plus landiolol (n=5), OVR-sham (n=6), OVR-sepsis (n=6) and OVR-sepsis plus landiolol (n=6). **A:** Indexed stroke volume (SVi). **B:** Cardiac index (CI). **C:** Indexed end-diastolic volume (EDVi). Data are expressed as means ± SEM

****p<0.0001 vs sham and vs OVR-sham, respectively

§ p<0.05; §§ p<0.01; §§§§ p<0.0001 vs sepsis and OVR-sepsis, respectively

††† p<0.001; †††† p<0.0001 vs control of corresponding group

reported, as compared with sham. In contrast, in OVR females, sepsis decreased the CI by 52% (p<0.0001) and SVi by 53% (p<0.0001), reflecting the global performance of the heart.

This change did not affect the cardiac systolic function, as there was no significant difference in left ventricular ejection fraction (LVEF), but the diastolic function: EDVi was decreased by

43% ($p<0.0001$), as compared with sham (Figure 2). Of note, sepsis did not affect left ventricular mass in both control and OVR females.

Table 2: Biological parameters 18 hrs after CLP

Biological parameter	Control			OVR		
	sham (n=5)	sepsis (n=5)	sepsis + Landiolol (n=4)	sham (n=6)	sepsis (n=6)	sepsis + Landiolol (n=5)
Evans Blue (ng/mg tissue)	59 ± 41	92 ± 22	108 ± 61	37 ± 28	125 ± 67	90 ± 50
Lactate (ng/μl)	74 ± 35	145 ± 66	111 ± 70	79 ± 44	191 ± 83	173 ± 92
Procalcitonin (pg/μl)	14 ± 10	20 ± 12	41 ± 26	20 ± 22	48 ± 38	39 ± 24

Evans Blue: Evans Blue tissue concentration in pulmonary right cranial lobe; **Lactate:** Lactate plasma concentrations; **Procalcitonin:** Procalcitonin plasma concentration. Data are expressed as means ± SD.

In control females, sepsis did not increase EB tissue concentration, as compared with sham. Similarly, in OVR females, sepsis did not increase EB concentration in lung tissues, as compared with sham ($p=0.054$). No significant differences were found in lactate and procalcitonin plasma concentrations after sepsis between control and OVR females (Table 2).

In order to identify transcriptional changes associated with ovariectomy in sepsis-induced cardiac dysfunction, we analysed by qPCR the expression in the left ventricle of genes encoding signalling proteins known for their role in cardiac and immune functions. In both control and OVR females, sepsis increased the myocardial expression of genes encoding

protein associated to inflammation, interleukin-6 (IL-6), IL-10 and IL-18, to cell cycle and survival, Janus Kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Table 3 and supplemental Table 2). Regarding pro-apoptotic genes, sepsis increased mitogen activated protein kinase 14 (MAPK14) in OVR females and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in control females (Table 3 and supplemental Table 2).

Table 3: Gene expression variation after sepsis

Biological processes	Gene	Effect of sepsis		Effect of landiolol in sepsis		Effect of sepsis + landiolol	
		Control	OVR	Control	OVR	Control	OVR
Pro-inflam-matory molecules	JAK2	↗	↗	=	=	↗	↗
	STAT3	↗	↗	=	=	↗	↗
	IL-1b	↗	=	=	↗	↗	↗
	IL-6	↗	↗	=	=	↗	↗
	IL-18	↗	↗	=	=	↗	↗
	TNF- α	↗	=	=	=	↗	=
Anti-inflam-matory molecules	IL-10	↗	↗	=	=	↗	↗
Apoptosis	MAPK14	=	↗	=	=	=	=
Adrenergic signalling pathway	CREM	↗	↗	=	↘	=	=
	ADRA1A	=	↘	=	=	=	=
	PLCB4	=	↘	=	=	=	=
	GRK5	=	↗	=	=	↗	=
	AKAP6	↘	↘	=	=	↘	=
Calcium signalling	SLC8A1	↘	=	=	=	=	=
	ATP2B2	=	↘	=	Norm.	↘	=
	RYR2	=	=	=	↗	=	=
	RYR3	=	=	=	↗	=	=
	SERCA2	=	=	=	=	↘	=
	SERCA3	↘	↘	Norm.	=	=	=
	CACNA1C	=	=	=	↗	=	=

	PLN	=	=	=	↗	=	=
Contractile apparatus	TUBA-8	↘	↘	=	=	↘	=
	MyH7B	=	↘	=	=	=	=

↗: upregulated; ↘: downregulated; =: not-regulated; Norm: Normalization. **Effect of sepsis:** sepsis vs sham. **Effect of landiolol in sepsis:** sepsis + landiolol vs sepsis. **Effect of sepsis + landiolol:** sepsis + landiolol vs sham

We then checked that JAK2 protein and transcript expression were correlated and looked at the phosphorylation level of STAT3 at its two phosphorylation sites Tyr705 and Ser727 by Western-Blot. The increase in JAK2 protein during sepsis was significant only in OVR females (Figure 3). Regarding STAT3 phosphorylation, both groups showed an increase at the Tyr705 site during sepsis while only OVR females showed a significant phosphorylation at the Ser727 site (Figure 3).

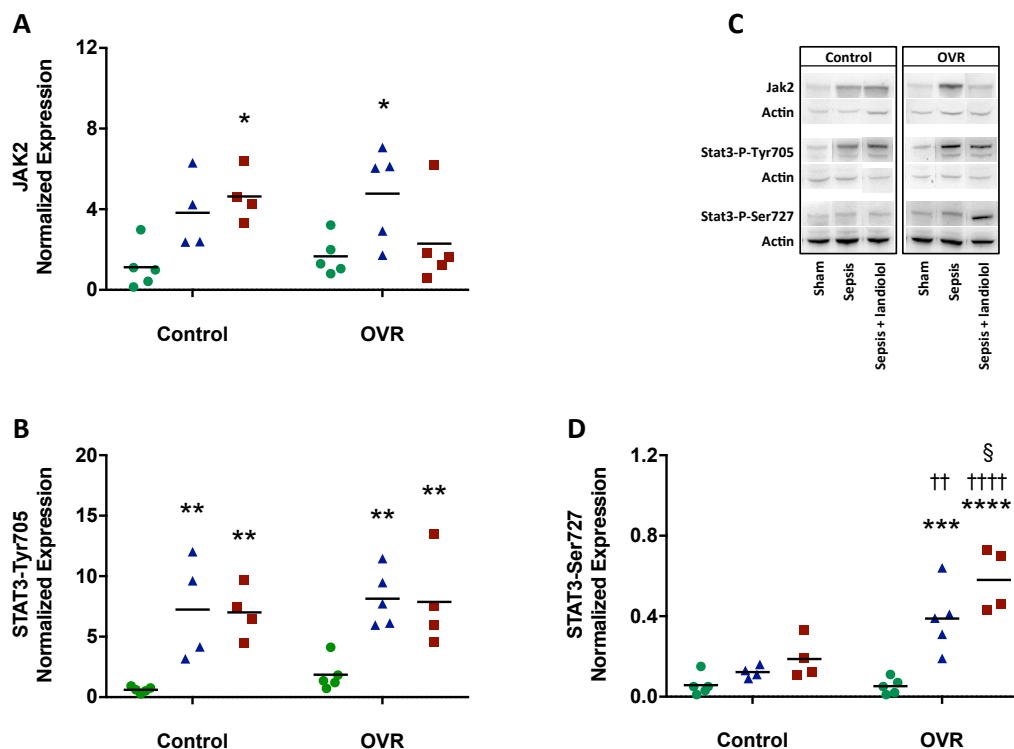


Figure 3: Left ventricular JAK2 expression and STAT3 phosphorylation assessed by western-blot in sham (n=5), sepsis (n=4), sepsis plus landiolol (n=4), OVR-sham (n=5), OVR-sepsis (n=5) and OVR-sepsis plus landiolol (n=4). **A:** JAK2 expression. **B:** STAT3-Tyr705 phosphorylation. **C:** The phosphorylation of STAT3 and the expression of JAK2 were normalized to actin on stripped blot. **D:** STAT3-Ser727 phosphorylation.

*p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ****p<0.0001 vs sham and vs OVR-sham, respectively

§ p<0.05 vs OVR-sepsis

†† p<0.01; †††† p<0.0001 vs control of corresponding group

Regarding transcripts of the adrenergic pathway, sepsis decreased the α -adrenergic receptor (α -AR) and phospholipase C beta 4 (PLCB4) expression and increased G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) that inhibits adrenergic pathways, only in OVR females (Table 3 and supplemental Table 2). In addition, sepsis acted differently on genes involved in excitation/contraction coupling. Thus, A-Kinase Anchoring Protein 6 (AKAP6), which binds to the regulatory subunit of protein kinase A (PKA), and tubulin alpha 8 (TUBA8) were decreased in both control and OVR females; however, the inhibition of the β -adrenergic/PKA pathway was potentiated by the increase of GRK5 in OVR females, in which the myosin heavy chain 7B (MYH7B) contractile protein was also decreased. Regarding relaxation, sepsis reduced the ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transporting 3 (SERCA3) expression in both groups and decreased solute carrier family 8-member 1 (SLC8A1) transcript expression, the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, in control female and the ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting protein (ATB2B2) expression in OVR female (Figure 4 and Table 3).

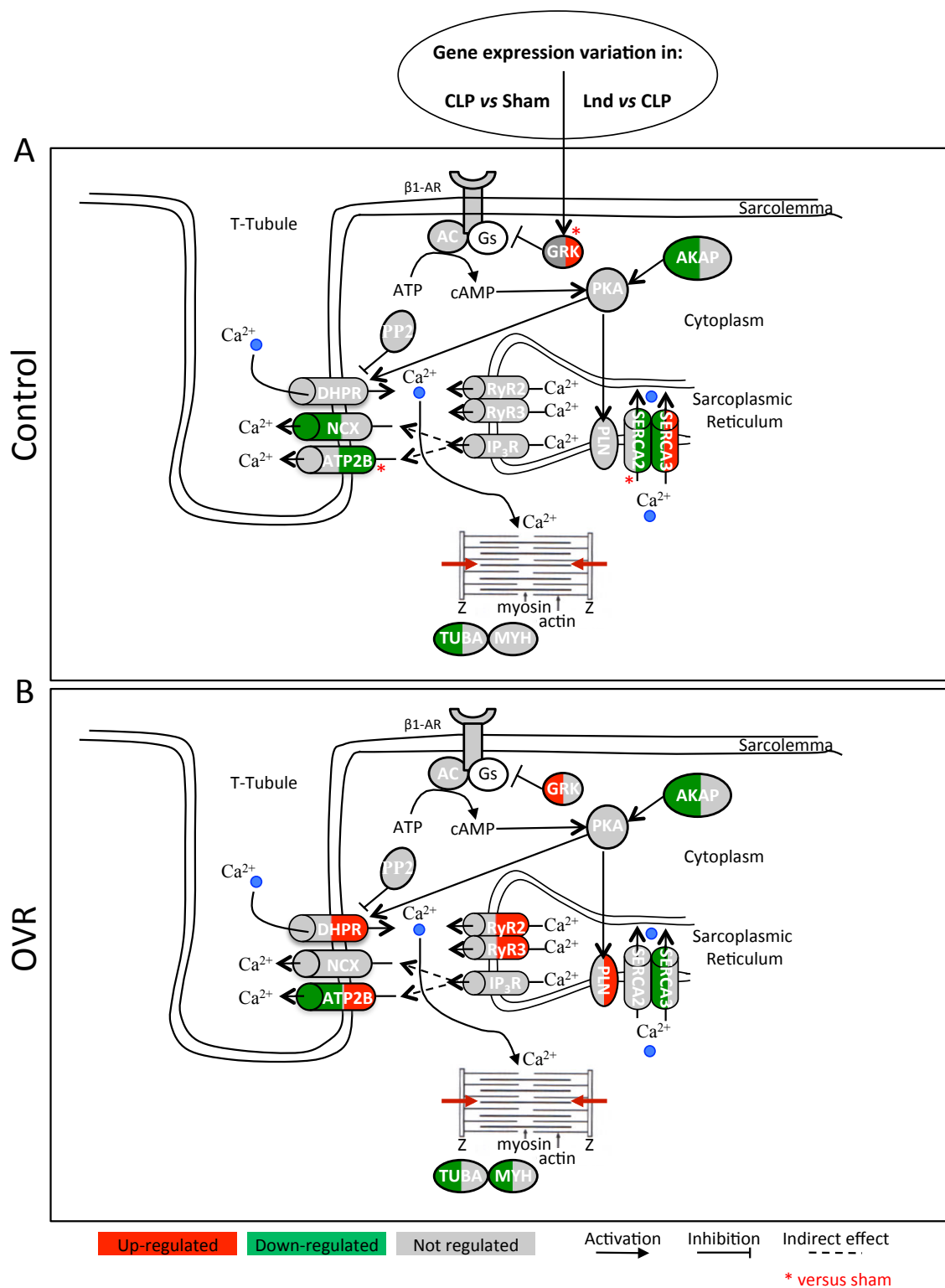


Figure X

264

265 **Figure 4: Transcripts regulation by sepsis and landiolol of the adrenergic and excitation/contraction**
 266 **coupling pathways. A: In control females. B: In OVR females.**

267 In red: up-regulated, green: down-regulated and grey: not regulated transcripts in sepsis vs
268 sham: left part of symbol, in sepsis+landiolol vs sepsis: right part of symbol; * in
269 sepsis+landiolol vs sham.

270

271 **Effects of landiolol on cardiac function OVR females**

272 Both in control and OVR females, landiolol administration after sepsis did not affect
273 physiological variables (Table 1).

274 Heart rate (HR) was lowered during landiolol administration in control and OVR females,
275 although the difference did not reach a significant level. In control females, landiolol
276 administered after sepsis decreased systolic blood pressure and mean blood pressure by 27%
277 and 30% respectively ($p<0.01$), as compared with sham. In contrast, landiolol administration
278 after sepsis did not affect blood pressure in OVR females (Table 1).

279 In control females, after sepsis, landiolol decreased the cardiac global performances: CI and
280 SVi were decreased by 44% ($p<0.0001$) and 37% ($p<0.01$) respectively. Conversely, in OVR
281 females, after sepsis, landiolol improved the impaired diastolic function and the cardiac global
282 performances as EDVi was increased by 33% ($p<0.01$) and SVi by 51% ($p<0.05$) (Figure 2).
283 Landiolol did not affect LVEF and LVM in control and OVR females.

284 In control females, after sepsis, landiolol did not change EB lung tissue concentration. No
285 differences of EB lung tissue concentration were found between OVR-sepsis females and
286 OVR-sepsis plus landiolol females. There were no differences in lactate and procalcitonin
287 plasma concentration between OVR-sepsis females and OVR-sepsis plus landiolol females
288 (Table 2).

289 Regarding transcripts regulation, landiolol up-regulated the transcript of IL-1b in OVR
290 females and potentiated the sepsis-induced increase of $\text{TNF}\alpha$ (Table 3).

Landiolol significantly increased JAK2 protein expression in control females, as compared with sham, while this expression decreased in OVR females being no longer different from sham. While STAT3 phosphorylation at Tyr705 remained high in both groups in the presence of landiolol, the potentiation of phosphorylation at Ser727 site was noted only in OVR females. The phosphorylation status at this site was higher, as compared with control females (Figure 3).

Regarding excitation/contraction coupling, landiolol increased the expression of GRK5 and maintained the decrease of AKAP6 that could contribute to the inhibition of the adrenergic/PKA pathways in control females and reversed the sepsis-induced elevation of cAMP Responsive Element Modulator (CREM) expression only in OVR females. Moreover, in OVR females, landiolol increased the expression of Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C (CACNA1C), Ryanodine Receptor 2 (RYR2) and 3 (RYR3), enhancing calcium entry into the cardiomyocytes in OVR females. At the level of relaxation, in control females, landiolol restored SERCA3 but decreased SERCA2 and ATP2B2 expression, which could contribute to Ca^{2+} efflux inhibition, whereas the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger remained down-regulated. Conversely, in OVR females, landiolol did not affect the expression of SERCA2, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger but increased the expression of ATP2B2 (Figure 4 and Table 3).

Mortality rates

There were no deaths in the sham control or OVR females before the end of the protocol. In control females, the mortality rate was 12,5% (1 animal) after sepsis and 42,8% (3 animals) in sepsis + landiolol group. In OVR females, this mortality rate was 0% after sepsis and 14,3% in the OVR sepsis + landiolol group. There was no statistically significant difference between the groups.

DISCUSSION

There is increasing evidence that sex, and particularly female hormones, affects the response to sepsis (2, 4, 14). However, the mechanisms of this phenomenon remained to be demonstrated. To our knowledge, we provide the first study comparing cardiac performances in OVR and control female septic rats. A major point of our approach is the assessment of cardiac function using MRI, thereby providing an in vivo evaluation of cardiac function that includes heart-vessels interactions. Our results highlight disparities between control and OVR female rats. No impairment of cardiac performances after sepsis was observed in control females whereas in OVR females, sepsis decreased SVi and CI related to an EDVi diminution.

Different mechanisms may explain this effect. The alteration in cardiac performance (decrease in SVi and CI) in septic OVR females was associated with a decrease in EDVi without effect on LVEF, DBP and MBP. This suggests a left ventricular diastolic dysfunction with a defect of filling during the diastole, while the venous return and the myocardial contractility were preserved. In our previous study (8), we showed that this effect was obtained in males, at variance with females.

Other experimental models have found improved survival in female mice after CLP compared to males (10, 14). This is in accordance with our present data in control females: in OVR septic females, the hemodynamic profile seemed to be close to that of septic males.

This suggests a protective effect of female hormones in sepsis, especially at the cardiovascular level. Female hormones have a protective effect on cardiac functions and cardiovascular response during major inflammation (4). Experimental administration of 17- β - α estradiol improved functional recovery after ischemia-reperfusion in rats (9). In an endotoxin-induced sepsis model, administration of 17- β - α estradiol mitigated septic cardiac dysfunction (15). Different mechanisms could explain the protective effect of female

hormones in sepsis; an immunomodulatory effect of oestrogens has been reported in various models (16). As these works have focus on oestrogens effects, our model, however, removes all ovarian hormones. Therefore, the measured effects could be imputed either to oestrogens or progesterone, or the combination of both. Further investigations are needed to determine the role of each female hormone in the protective processes of the cardiac function in sepsis. Short acting β -blocker treatment may be a promising therapeutic approach in sepsis. Its efficacy has been shown in male rats septic models (8, 17). Our study confirms these findings in OVR females, since landiolol administration during sepsis improved SVi and CI with an increase in EDVi. The present report suggests that the lack of effect of landiolol in females was mediated by female hormones. Thus, landiolol improved cardiac performance in conditions suggesting a reduced exposure to female hormones during sepsis.

In the second part of our study, we looked for the underlying mechanism of changes in hemodynamic profiles. We previously identified, in a transcriptomic study, major differences in sepsis-induced deregulation of gene expression in male and female rats and confirmed the benefit of landiolol intake on cardiac function in male (13). Our current results highlight a similar gene expression profile in OVR females to that found in males. In particular, septic OVR females showed a more pronounced inflammatory and apoptotic profile, including the JAK/STAT pathway. In addition, decreased expression of genes involved in the α - and β -adrenergic pathways, as well as in Ca^{2+} efflux, could explain the decreased blood pressure and diastolic dysfunction observed in OVR females. In these animals, landiolol improved cardiac performances, which was supported by the restoration of JAK2 expression, and the overexpression of genes responsible for Ca^{2+} influx in cardiac cells. Conversely, the deleterious effect of landiolol in control females may be explained by the overexpression of JAK2, associated with a decreased expression of genes involved in Ca^{2+} efflux and β -adrenergic regulation. These results are in line with findings on the human cardiopathy during

sepsis (18). In septic rat, dysregulation of genes involved in α -adrenergic, β -adrenergic and Ca^{2+} cycling pathway was associated with reduced survival (19). These transcriptomic regulations reduce the L-type calcium current (20) and increase the cytosolic calcium that lead to failure of diastolic relaxation, and decrease the calcium concentration in the sarcoplasmic reticulum, which affect systolic contraction as previously described in septic cardiomyopathy (21).

In contrast to previous studies (8, 22), we did not show any significant decrease in HR during treatment with landiolol, regardless of hormonal status. This lack of difference may be explained by a relatively low number of analysed rats, which probably was a drawback for statistical correlations. Another possible explanation could be a sub-optimal dosage of landiolol. This, however, seems unlikely since we used the same dosage as that previously used to obtain a decrease in HR (8).

During sepsis, there are structural and functional changes in the endothelium responsible for endothelial dysfunction and microcirculation disorders (23, 24), resulting in higher permeability and oedema. Estradiol administration in male rats and in OVR females has been shown to improve intestinal microcirculation during sepsis (25). However, we found no significant differences in EB lung tissue concentration between the various groups, although there was a trend toward an increased permeability in OVR females. Further investigations are needed to define the effects of female hormones on pulmonary endothelium and microcirculation during sepsis.

Our study has several limitations. Our experimental model of sepsis, CLP, is considered as the reference method (26), but the main drawback of this method is its lack of reproducibility (27, 28). We attempted to reproduce the experimental conditions obtained in our previous study. However, we reduced the vascular filling performed during the 18 hours after CLP, to better mimic the initial phase of human septic shock. This could have result in differences in the

severity of sepsis compare to our previous work, and partially explain the differences we found in genes expression in control females rats following CLP and landiolol, compare to our previous study. This also resulted in an increased mortality in our septic animals. Nevertheless, we found deleterious consequences and more impaired cardiac performance in the rats assessed in the group with the highest mortality (sepsis plus landiolol females). Another limitation was that our study did not assess the baseline response to landiolol. Landiolol is hydrolysed to an inactivate metabolite by esterases, which activities are higher in female rats than in male rats (29). Whether this activity can be affected by OVR is unknown. Response to general anesthesia may also be sex-mediated (30), and therefore affected by OVR. Finally, the plasma concentrations of female sex hormones are likely to vary depending on oestrus cycle in females, and this cycle was not considered during sepsis.

CONCLUSIONS

Our model confirms that cardiac function was more impaired in septic OVR females, as compared with control females, suggesting a protective effect of female hormones on septic cardiac dysfunction. This difference in cardiac performances was associated with a more pronounced activation of inflammation pathways and inhibition of adrenergic pathways in OVR females. Landiolol, while it produced deleterious effects in control females, prevented cardiac dysfunction in OVR females due to an improvement in diastolic function, thereby mimicking its known effect in males. This was supported by an overexpression of genes involved in the Ca^{2+} influx in OVR females while an inactivation of the β -adrenergic and the Ca^{2+} efflux pathways was observed in control females. Interactions between sex hormones and β -blocker deserve further investigations on larger series to better understand the cellular mechanisms leading to a protective effect in sepsis.

REFERENCES

1. Kisat M, Villegas CV, Onguti S, Zafar SN, Latif A, Efron DT, Haut ER, Schneider EB, Lipsett PA, Zafar H, Haider AH: Predictors of sepsis in moderately severely injured patients: an analysis of the National Trauma Data Bank. *Surg Infect* 14(1):62–68, 2013.
2. Mahmood K, Eldeirawi K, Wahidi MM: Association of gender with outcomes in critically ill patients. *Crit Care Lond Engl* 16(3):R92, 2012.
3. Reade MC, Yende S, D'Angelo G, Kong L, Kellum JA, Barnato AE, Milbrandt EB, Dooley C, Mayr FB, Weissfeld L, Angus DC, Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis Investigators: Differences in immune response may explain lower survival among older men with pneumonia. *Crit Care Med* 37(5):1655–1662, 2009.
4. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH: Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5(1):12–19, 2014.
5. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL: Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg Chic Ill 1960* 134(9):935–938; discussion 938-940, 1999.
6. Gannon CJ, Pasquale M, Tracy JK, McCarter RJ, Napolitano LM: Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia. *Shock Augusta Ga* 21(5):410–414, 2004.
7. Chen J, Chiazza F, Collino M, Patel NSA, Coldewey SM, Thiemermann C: Gender dimorphism of the cardiac dysfunction in murine sepsis: signalling mechanisms and age-dependency. *PloS One* 9(6):e100631, 2014.
8. Mathieu C, Desrois M, Kober F, Lalevée N, Lan C, Fourny N, Iché-Torres M, Tran TT, Lê LT, Singer M, Mège J-L, Bernard M, Leone M: Sex-Mediated Response to the Beta-Blocker Landiolol in Sepsis: An Experimental, Randomized Study. *Crit Care Med* 46(7):e684–e691, 2018.
9. Wang M, Tsai BM, Reiger KM, Brown JW, Meldrum DR: 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 40(2):205–212, 2006.

10. Diodato MD, Knöferl MW, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH: Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 14(3):162–169, 2001.
11. Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M: Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane. *Magn Reson Mater Phys Biol Med* 17(3–6):157–161, 2004.
12. Wang H-L, Lai TW: Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci Rep* 4:6588, 2014.
13. Tran TT, Mathieu C, Torres M, Loriod B, Lê LT, Nguyen C, Bernard M, Leone M, Lalevée N: Effect of landiolol on sex-related transcriptomic changes in the myocardium during sepsis. *Intensive Care Med Exp* 7, 2019.
14. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH: Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med* 25(1):106–110, 1997.
15. Zhu H, Shan L, Peng T: Rac1 mediates sex difference in cardiac tumor necrosis factor- α expression via NADPH oxidase-ERK1/2/p38 MAPK pathway in endotoxemia. *J Mol Cell Cardiol* 47(2):264–274, 2009.
16. Cristofaro PA, Opal SM, Palardy JE, Parejo NA, Jhung J, Keith JC, Harris HA: WAY-202196, a selective estrogen receptor-beta agonist, protects against death in experimental septic shock. *Crit Care Med* 34(8):2188–2193, 2006.
17. Suzuki T, Morisaki H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishizaka A, Takeda J: Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* 33(10):2294–2301, 2005.
18. Matkovich SJ, Al Khiami B, Efimov IR, Evans S, Vader J, Jain A, Brownstein BH, Hotchkiss RS, Mann DL: Widespread Down-Regulation of Cardiac Mitochondrial and Sarcomeric Genes in Patients With Sepsis. *Crit Care Med* 45(3):407–414, 2017.

- 466 19. Rudiger A, Dyson A, Felsmann K, Carré JE, Taylor V, Hughes S, Clatworthy I, Protti A, Pellerin D,
467 Lemm J, Claus RA, Bauer M, Singer M: Early functional and transcriptomic changes in the
468 myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci* 124(6):391–401, 2013.
- 469 20. Stengl M, Bartak F, Sykora R, Chvojka J, Benes J, Krouzecky A, Novak I, Sviglerova J, Kuncova J,
470 Matejovic M: Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with
471 hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* 38(2):579–587, 2010.
- 472 21. Duncan DJ, Yang Z, Hopkins PM, Steele DS, Harrison SM: TNF-alpha and IL-1beta increase Ca²⁺
473 leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular
474 myocytes. *Cell Calcium* 47(4):378–386, 2010.
- 475 22. Hagiwara S, Iwasaka H, Maeda H, Noguchi T: Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor
476 antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock*
477 *Augusta Ga* 31(5):515–520, 2009.
- 478 23. Opal SM, van der Poll T: Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*
479 277(3):277–293, 2015.
- 480 24. Russell JA, Rush B, Boyd J: Pathophysiology of Septic Shock. *Crit Care Clin* 34(1):43–61, 2018.
- 481 25. Sharawy N, Pavlovic D, Wendt M, Cerny V, Lehmann C: Evaluation of the effects of gender and
482 estradiol treatment on the intestinal microcirculation during experimental sepsis. *Microvasc*
483 *Res* 82(3):397–403, 2011.
- 484 26. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M: Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug*
485 *Discov* 4(10):854–865, 2005.
- 486 27. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF: Cecal ligation
487 and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality,
488 bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch*
489 *Rech Chir Eur* 33(2):77–79, 2001.

28. Singleton KD, Wischmeyer PE: Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 35(6):486–491, 2003.
29. Illsley NP, Lamartiniere CA: Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity. *Endocrinology* 108(5):1737–1743, 1981.
30. Zambricki EA, Dalecy LG: Rat sex differences in anesthesia. *Comp Med* 54(1):49–53, 2004.

Acknowledgements: we are grateful to Magali Iche-Torres for technical support.

Fundings: This work was supported by France Life Imaging (grant ANR-11-INBS-0006).

Author Contributions:

Conceived the study: A.X, C.M, N.L, M.B and M.L. Performed surgeries: A.X. Performed tests: A.X, F.G, T.T, F.K and N.F. Performed analysis of results: A.X, F.G, F.K and N.L. Wrote manuscript: A.X, N.L, M.B and M.L. Revised manuscript and agreed with submission: All authors

Additional Information:

Competing interest: The authors declare that they have no competing interests

Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments :The authors declare that this study is reported in accordance with ARRIVE guidelines

Number of words: Abstract, 300 words ; Text, 4953 words

Supplemental data

Bilateral ovariectomy procedure

The surgery was performed under general anesthesia combining an inhaled anesthesia with halogenated gas (isoflurane) and morphine (buprenorphine 0.05 mg/kg, sub-cutaneous). After induction with isoflurane 5% in an induction chamber, anesthesia was maintain using a facial mask. The rats were kept in spontaneous ventilation using 2% isoflurane combined with 1.5L /min of oxygen. The depth of the anesthesia was checked by the disappearance of the leg withdrawal reflex. The rats were placed on a hot plate for the duration of the surgery to prevent hypothermia.

After mowing and skin disinfection, a 2 cm transverse skin incision was made on the animal's back, just below the rib cage. After dissection of the subcutaneous tissue, a small muscle incision was made on each side of the midline, approximately 0.5 cm from the latter. The peri-ovarian fat was then identified and carefully exteriorized outside the abdominal cavity. The ovary and oviduct were located within the fat. For control procedures, the ovaries were simply replaced in the abdominal cavity. For bilateral ovariectomy procedures, a ligature was performed at the level of the oviduct and the 2 ovaries were removed. The uterus and the remaining part of the oviduct were then replaced in the abdominal cavity and the closure was done by suturing the muscular planes and then the skin. Perioperative rehydration by injection of 1 ml of 0.9% NaCl subcutaneously was performed at the end of the intervention.

MRI Assessment of In Vivo Cardiac Function

Cardiac MRI was performed 18 hours after the induction of sepsis, immediately after placement of the arterial catheter. The images were acquired on a Bruker Biospec Avance 4.7 T / 30 system (equipped with a horizontal magnet of 4.7 Tesla) with the exception of one animal for which the images were acquired on a Bruker Pharmascan 7 system .0 T / 16 (fitted

with a 7.0 Tesla horizontal magnet). The rat was placed in a prone position on a surface probe allowing the reception of radio frequency signals and was then placed into the magnet. A volume proton resonator (60 mm in diameter and 80 mm in homogeneous length) was used as a homogeneous source of excitation radio frequency. During images acquisition, anesthesia was maintain with isoflurane combined with 1.5 L / min of oxygen, via a facial mask, at concentrations between 1.8 and 2% allowing the maintenance of spontaneous ventilation. A heating blanket was placed over the animal to prevent hypothermia. The electrocardiogram (ECG) was monitored by two electrodes placed subcutaneously, and the respiratory rate was monitored by a ventral balloon. The servo control of magnetic resonance acquisition by the ECG and respiration was carried out using a synchronization unit from the company Rapid Biomedical and the Acq Knowledge interface.

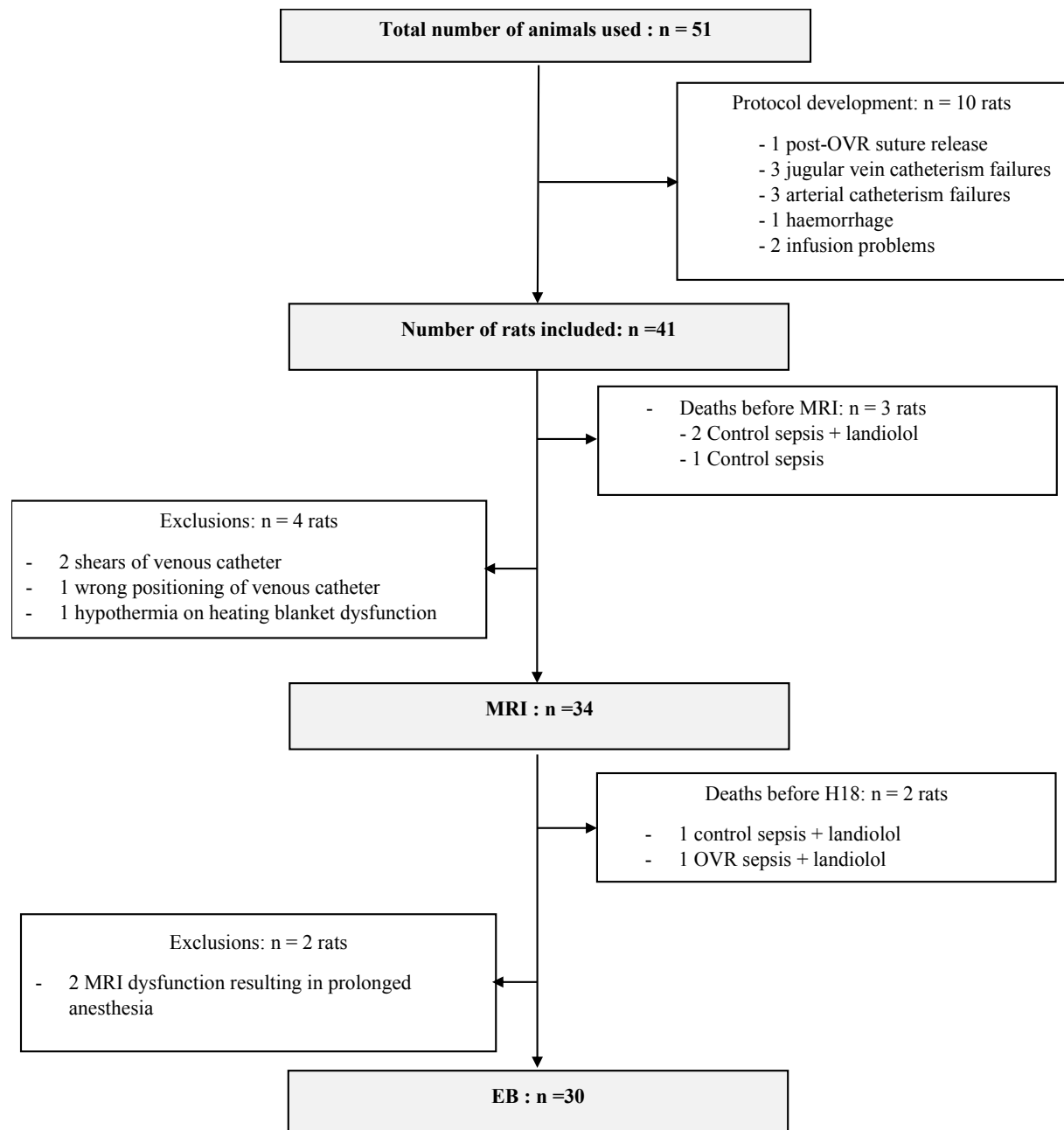
The cine-MRI sequence was used to acquire the short-axis and long-axis orientation sections 2 chambers and 4 chambers (FLASH, Field Of View 4 x 4 cm², cutting thickness 2 mm, size of the matrix 128 x 128, repetition time TR = 5.1 ms, echo time TE = 1.2 ms, approximately 45 phases per cardiac cycle). Images acquisition was synchronized with the ECG.

Image processing was carried out using post-processing tools developed in the laboratory operating in the IDL environment (Interactive Data Language, Excelis, United States) without having knowledge of the groups to which the animals belonged. The determination of the left ventricular volumes used the ellipsoid model; where the left ventricle is assimilated to an ellipsoid of revolution. The endocardial and epicardial areas were drawn manually on the images of the strict minor axis section and the ventricular length on the strict 4-chamber major axis section; in systole and diastole.

Biochemical analyses in plasma

Plasma lactate concentration was measured using the Lactate assay kit II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and plasma procalcitonin concentration was determined using the PCT

BioAssay™ ELISA Kit (US Biological, Salem, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.



Supplemental figure 1: Flow-Chart. EB: Evans Blue experiments

Supplemental Table 1: qPCR

	Non OVR			OVR		
	Sham (n=5)	CLP (n=4)	CLP + landiolol (n=4)	Sham (n=5)	CLP (n=5)	CLP + landiolol (n=5)
Pro-inflammatory Molecules						
IL-6	15.7 ± 0.2	4.5 ± 1.1****	4.0 ± 1.8****	15.8 ± 0.3	4.0 ± 0.8****	3.0 ± 1.2****
TNFA	9.8 ± 0.3	8.1 ± 1.2*	7.1 ± 0.9***	8.8 ± 0.3	7.7 ± 0.2	7.5 ± 1.3
TNFRSF26	6.8 ± 0.6	6.2 ± 0.3	6.0 ± 0.6	6.6 ± 0.5	6.4 ± 0.4	5.9 ± 0.7
JAK2	4.3 ± 0.5	3.0 ± 0.8**	2.4 ± 0.3****	3.9 ± 0.5	1.9 ± 0.1****, ††	2.2 ± 0.5****
STAT3	1.9 ± 0.6	1.0 ± 0.4**	0.7 ± 0.4***	1.6 ± 0.4	0.1 ± 0.2****, ††	0.5 ± 0.4***
IL-1B	7.7 ± 1.1	5.1 ± 1.2***	4.4 ± 0.5****	6.8 ± 0.7	5.6 ± 0.6	4.1 ± 1.2***, §
IL-18	7.6 ± 0.3	5.8 ± 0.1****	5.5 ± 0.3****	6.8 ± 0.5†††	5.7 ± 0.2****	5.3 ± 0.3****
AKT2	2.3 ± 0.5	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.5	2.1 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2
PPP2ACA	0.6 ± 0.2	1.0 ± 1.2	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.3
NFKB1	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.4	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.1	3.6 ± 0.4
Anti-inflammatory Molecules						
IL-10	13.4 ± 1.4	9.1 ± 0.5****	9.5 ± 0.8****	12.9 ± 0.4	9.2 ± 0.6****	9.1 ± 0.8****
Apoptosis						
BCL2	5.0 ± 0.6	5.5 ± 0.9	5.2 ± 0.4	4.6 ± 0.5	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.6
CREM	3.3 ± 0.5	2.2 ± 0.6**	2.9 ± 0.6	3.7 ± 0.2	2.2 ± 0.4***	3.1 ± 0.6§
MAPK14	3.3 ± 0.5	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.0 ± 0.4	2.0 ± 0.3**, †††	2.6 ± 0.5†
Adrenegic Pathway						
ADRA1A	3.2 ± 0.7	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.8	2.8 ± 0.3	4.0 ± 0.4*	3.6 ± 0.7
PLCB4	2.2 ± 0.5	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.4	3.2 ± 0.2***	2.6 ± 0.5
PRKACA	0.6 ± 0.5	1.5 ± 1.2	1.4 ± 0.7	0.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.4
GRK5	4.3 ± 0.7	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.4*	3.5 ± 0.5†	2.6 ± 0.1**, ††	3.2 ± 0.3
ADCY9	4.8 ± 0.6	5.1 ± 0.6	5.2 ± 0.5	4.5 ± 0.5	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.3
Calcium Signaling						
AKAP6	2.0 ± 0.5	2.9 ± 0.5*	2.9 ± 0.6*	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2**	2.3 ± 0.7
ITPR1	4.0 ± 0.6	3.7 ± 0.6	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.8	3.8 ± 0.3
SLC8A1	1.6 ± 0.4	2.9 ± 1.3*	2.8 ± 1.1	1.6 ± 0.3	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.3
ATP2B2	6.2 ± 0.9	7.4 ± 0.4	8.1 ± 0.7**	7.0 ± 1.3	8.7 ± 0.4*	7.1 ± 0.8§
RYR2	-0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6	-0.5 ± 0.3	-0.1 ± 0.5	-0.9 ± 0.3§§, †††
RYR3	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.5 ± 0.4§
SERCA2	-4.3 ± 0.4	-3.9 ± 0.5	-2.9 ± 1.5*	-4.4 ± 0.3	-4.4 ± 0.3	-4.9 ± 0.3†††
SERCA3	7.3 ± 0.2	8.3 ± 0.6**	7.5 ± 0.3§	7.1 ± 0.5	7.9 ± 0.1*	7.2 ± 0.4
CACNA1C	2.6 ± 0.6	2.8 ± 0.5	3.0 ± 0.5	2.2 ± 0.3	2.8 ± 0.5	2.0 ± 0.3§, ††
PLN	-2.8 ± 0.3	-2.4 ± 0.4	-2.2 ± 0.9	-3.1 ± 0.3	-2.6 ± 0.2	-3.4 ± 0.4§, ††
Contractil Apparatus						
TUBA8	1.2 ± 0.5	3.0 ± 1.6*	3.1 ± 0.7*	1.4 ± 0.7	2.9 ± 0.4*	2.2 ± 0.9
MYH7B	4.6 ± 0.3	4.9 ± 1.1	5.4 ± 0.5	4.6 ± 0.3	6.0 ± 0.4**, †	5.5 ± 0.8

Supplemental Table 1: Effects of CLP and landiolol on expression levels of different genes after 18 hours. Data are expressed as average delta cycle threshold (deltaCT) and RPL32 is the housekeeping gene; the lower the deltaCT value, higher the expression. Data are expressed as means ± standard error (SD).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sham Non OVR and vs. sham OVR respectively;

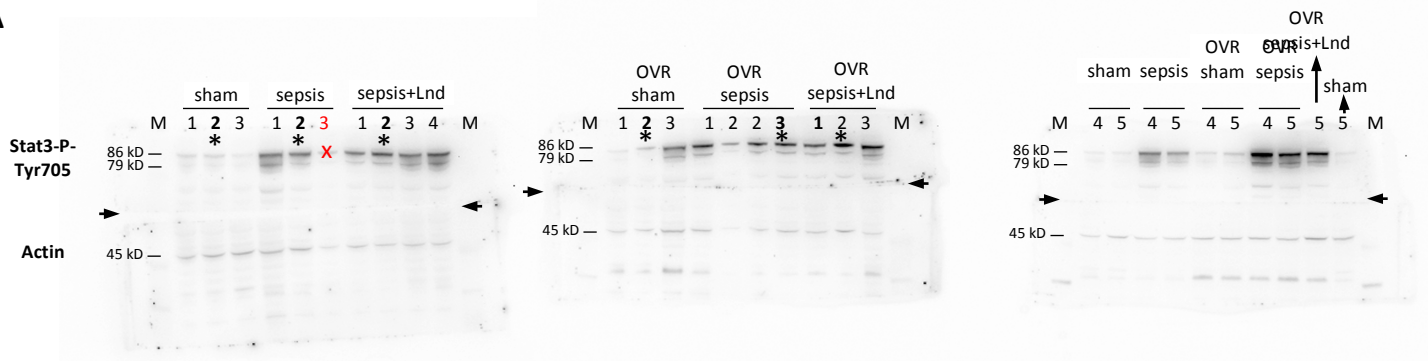
§ $p < 0.05$ vs. CLP female;

† $p < 0.05$ vs. Non OVR of the equivalent group.

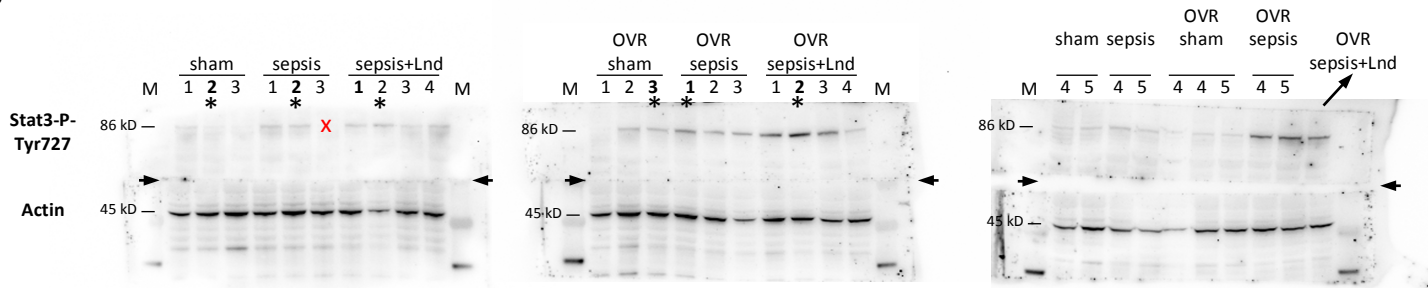
Supplemental Table 2 : Primers

Gene	Forward	Reverse
RPL32	TGTCCTCTAAGAACCGAAAAGCC	CGTTGGGATTGGTGACTCTGA
TUBA8	TATACGGTGGGCAAGGAGAG	CCCACCAAAACTGTGGAAGA
MYH7B	GCAGGACCTAGTGGACAAGC	GCTCCTCAGCGTCGTCTAAC
AKAP6	GCCGAGAAACAGCTCCAATA	ACCTCAGAATGGAGGCCACT
TNFA	ACCACGCTCTTCTGTCTACTG	CTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-1B	CTGTGACTCGTGGGATGATG	GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT
IL-18	CAAAAGAAACCCGCTGTGT	TCACAGCCAGTCCTCTTACTTCAC
JAK2	CAAAGTCTTGCCACAGGACA	CCAAAGCTCCACACATCTGA
IL-6	AGCCAGAGTCATTGAGAGCA	AGAGCATTGGAAGTTGGGGT
IL-10	CCTTACTGCAGGACTTTAAGGGTTA	TTTCTGGGCCATGGTTCTCT
NPR3	CTCCAAACAGTCACCCCTGC	GCAAAGCCAGAACGTAAGAG
AKT2	AGCATCGGTTCTTCTCAGC	GCGGTGAATTCATCATCAAA
BCL2	TGAACCGGCATCTGCACAC	CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG
PPP2CA	GTTGGTGTCCAGAGCTCACC	CAGCTTGGTTACCACAACGA
NFKB1	ATGACCTGGACGACTCTTGG	GGCTCATATGGTTTCCCAT
ADRA1A	CGAGTCTACGTAGTAGCC	GTCTTGGCAGCTTTCTTC
PLCB4	AGCTGAAGCTCTCCCATGAC	CCCGTTCTGCCTTATTCTTG
CREM	AGTCCCCAGCAACTAGCAGA	TCTTCTTCCTGCGACACTCC
ITPR1	TCGATATCATCACAGCCCTC	GATGGCCAGGAGTAGCTTTG
PRKACA	TCTTCGCTGACCAGCCTATC	CGAAGCAGGTCCTTCAAGTC
GRK5	AAGAGGCACCCCTTCTTCAG	CTATGTCCAGCACATCCTTG
SLC8A1	TTGTCGCTCTTGGAACCTCA	TTGCTTCCGGTGACATTGC
ATP2B2	GCATCTTCATAGGCCTGGGA	CTTCTGTGTTAGCCGCCCT
STAT3	TTCGGAAAGTATTGTCGCCC	AATGGTATTGCTGCAGGTCG
TNFRSF26	TGGAGATGTGCCATGATTGC	TGCTTGGAGTCACACACAGT
MAPK14	GCCCAGATGCCGAAGATG	CCAGCATCTTTTCCAGCAGG
ADCY9	TCACACATCACCTCCGAGTT	GTTACAGTAGTGACGACGG
RYS2	GCTGAACTATTTTGCTCGCAAC	CCACAGAAGAAGTGGAGACCT
RYS3	TGAGCCGGATATGAAGTGTG	CCAGCGGGATCTTCAATTTC
SERCA2	ATTGTTTGAAGTCTGCCTTCTGTGG	CATAGGTTGATCCAGTTATGGTAAA
SERCA3	GTATGACGCTGAGGGACCAC	GGAAGCGTGACTCAAAGACC
CACNA1C	TTGACAATGTTCTGGCAGCC	TCTGGCCACCCCTCGA
PLN	TACCTTACTCGCTCGGCTATC	CAGAAGCATCACAATGATGCAG

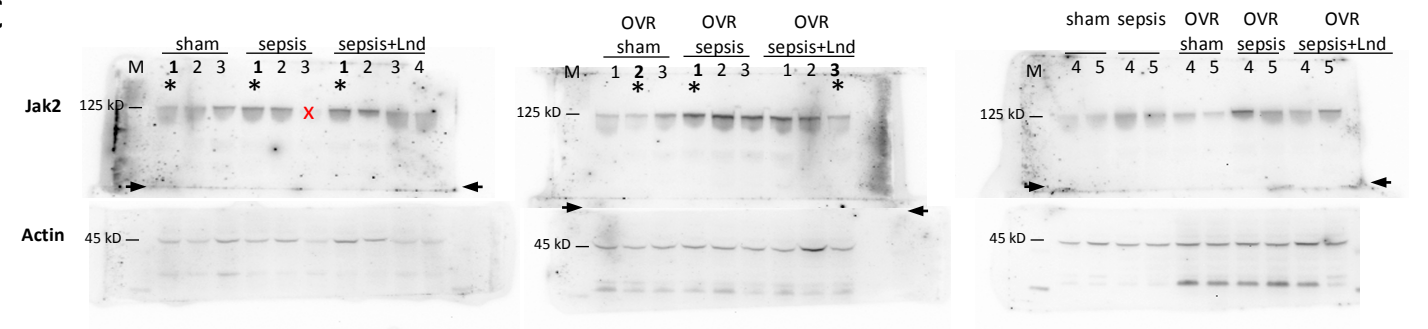
A



B



C



Supplemental Figure 3: Western blot assay for phosphorylated STAT3 and JAK2.

Blot photos after incubation with antibodies specific for STA3 STAT3-P-Tyr705 (A), STAT3-P-Ser727 (B) and JAK2 (C). Before hybridization, membranes were cut according to the molecular weights of the tested proteins at the points indicated by the arrows. The samples marked with an asterisk are those used to illustrate Figure 3. Sepsis 3 sample was different from all other samples in the sepsis group and was excluded from the statistical analysis.

Lnd: Landiolol; OVR: Ovariectomized.

3.3. Synthèse de l'article 3

Des IRM réalisées 18h après la CLP ont montré que le sepsis diminuait le SVi, l'index cardiaque (CI) et l'EDVi comparé au groupe Sham chez les femelles OVR alors qu'il n'avait pas d'effet chez les femelles contrôles. Cet effet était associé à une sur-expression de la protéine JAK2 et de la forme phosphorylée de STAT3 sur le site Ser727. On observait également une inhibition des transcrits des voies adrénergiques. Le landiolol augmentait le SVi en inversant la réduction d'EDVi suite au sepsis chez les femelles OVR, alors qu'il diminuait le SVi et le CI chez les femelles contrôles. Ceci était corrélé à une restauration d'expression de la protéine JAK2, une sur-expression des gènes impliqués dans l'influx calcique chez les femelles OVR alors qu'une sur-expression de la protéines JAK2, une inactivation de la voie β -adrénergique et de la voie d'efflux du calcium était observée chez les contrôles. En conclusion, le sepsis diminue les performances cardiaques chez les femelles OVR en induisant plus d'inflammation, en inhibant les voies adrénergiques et en dérégulant les flux calciques. Le landiolol prévient cette dysfonction cardiaque chez les femelles OVR, probablement en diminuant l'inflammation, activant l'influx de calcium, alors qu'il a un effet délétère chez les femelles contrôles chez qui l'efflux de calcium est diminué et l'inflammation augmentée.

4. Discussion

4.1. Intérêt du modèle de rat CLP

La ligature et ponction caecale (CLP) chez le rat est considérée comme un modèle standard pour l'étude des septicémies. L'évolution et la gravité du sepsis chez les animaux sont bien corrélées avec ce qui se passe chez l'homme (Dejager et al., 2011). Le principal inconvénient de cette méthode est son manque de reproductibilité. Ainsi, l'intensité du sepsis et la mortalité peuvent varier selon la taille de l'aiguille utilisée, le nombre de ponctions, la pression exercée sur le caecum, la distance de caecum ligaturé et les thérapeutiques instaurées (remplissage vasculaire, antibiotiques, catécholamines) (Otero-Antón et al., 2001). Nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales pour induire la CLP dans nos trois études afin de reproduire la même intensité de sepsis. Cependant, dans l'étude 3, nous avons choisi de diminuer le remplissage vasculaire, effectué pendant les 18h suivant le sepsis, afin qu'il soit plus proche des thérapeutiques effectuées lors du choc septique chez l'homme. Ceci a eu pour conséquence d'augmenter la mortalité liée au sepsis chez nos animaux. Ceci pourrait expliquer la différence

d'expression de certains gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1B, IL-6 et IL-18 chez les femelles septiques entre les études 1 et 3.

4.2. Statut des hormones sexuelles femelles et dysfonction myocardique septique : modulation de la réponse immunitaire

Nous avons vu que la dysfonction cardiaque induite par la CLP était moins prononcée chez les femelles que chez les mâles et que chez les femelles OVR. Ces résultats suggéreraient que les hormones sexuelles femelles ont des effets protecteurs sur la dysfonction myocardique septique. En revanche, le sexe masculin ne montre pas ces effets protecteurs. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques chez les femmes septiques qui montraient un meilleur taux de survie que les hommes (Schröder et al., 1998). Cet effet protecteur a également été retrouvé chez la souris femelle septique après CLP (Diodato et al., 2001 ; Zellweger et al., 1997). Par ailleurs, il a été montré que les hormones sexuelles femelles possèdent un effet protecteur sur la fonction myocardique et la réponse cardiovasculaire lors de phénomènes inflammatoires majeurs comme dans le cas de trauma-hémorragie, d'ischémie et de sepsis (Angele et al., 2014). Également, l'administration de 17- β -œstradiol a montré une amélioration de la dysfonction myocardique lors de la défaillance cardiaque aiguë survenant dans l'ischémie cardiaque chez les rats mâles et chez les rats femelles OVR (Wang et al., 2006) ou le sepsis endotoxémique chez la souris (Zhu et al., 2009). Dans ces modèles, des auteurs ont montré que l'administration de 17- β -œstradiol diminuait la réponse inflammatoire avec une réduction de la production des cytokines inflammatoires, TNF- α (Zhu et al., 2009) et IL-6, et de l'activation de p38 MAPK et de la Caspase-3 (Wang et al., 2006). Nos résultats montrent aussi que le sepsis induit une réponse inflammatoire qui est moins prononcée chez les femelles que chez les mâles en jouant sur plusieurs voies de signalisation (**Figure 21**, étude 2), et que chez les femelles OVR sur la voie JAK/STAT (**Figure 2 supplément**, étude 3).

4.3. Statut des hormones sexuelles femelles et régulation de la voie β -adrénergique au cours du sepsis

Le défaut de contractilité cardiaque est une cause majeure de la cardiomyopathie septique (Hobai et al., 2015) ; il est directement relié à la voie adrénergique (Rudiger and Singer, 2007). Dans le sepsis, la stimulation β -adrénergique augmente initialement la fréquence cardiaque et la contractilité mais également les besoins du myocarde en oxygène, pouvant conduire, en cas de déséquilibre entre apports et besoins, à une souffrance des cellules myocardiques. Lorsque

les besoins en oxygène sont supérieurs aux apports, les cellules du myocarde risquent la mort cellulaire. Pour prévenir ces dommages, les cellules myocardiques diminuent leurs besoins en oxygène par une diminution des β -AR et par une dépression des voies de signalisation en aval (Rudiger and Singer, 2007). Dans un modèle murin endotoxémique, la sensibilité des cardiomyocytes à un β -agoniste, l'isoprotérénol, augmentait dans les 12 premières heures puis diminuait à la 36^{ème} heure (Abi-Gerges et al., 1999). Le récepteur β 1-adrénergique semblait précocement externalisé puis internalisé avec réduction de sa densité membranaire. Dans notre étude, l'expression du récepteur β 1-adrénergique ne change pas au cours du sepsis ni après traitement au landiolol. Il faut noter que l'on regarde les effets du landiolol 18h après l'induction septique, donc leur expression pourrait être restaurée après une augmentation au début du sepsis.

En regardant les cibles en aval de β 1-AR, l'expression des gènes de la voie β 1-AR et de la voie calcique était diminuée dans toutes les conditions septiques mais il semble que la dérégulation dans ces voies était plus prononcée chez les mâles (**Figure 20**, étude 2) et les femelles OVR (**Figure 4**, étude 3) que chez les femelles contrôles, ce qui pourrait expliquer les perturbations cardiaques plus prononcées dans ces deux premiers groupes.

L'interaction entre les récepteurs aux œstrogènes et β -adrénergiques est également impliquée dans la régulation de la contraction cardiaque en modulant l'expression des protéines agissant sur le taux de calcium intracellulaire (Machuki et al., 2018). De plus, l'administration de 17- β -œstradiol induit une diminution de l'expression des β 1-AR chez les rates OVR lors d'une lésion d'ischémie/reperfusion (Kam et al., 2004).

4.4. Statut des hormones sexuelles femelles sur l'effet des β -bloquants dans le sepsis

Le traitement par β -bloquant constitue une approche thérapeutique prometteuse dans le sepsis. Si son efficacité a été démontrée dans plusieurs modèles animaux septiques mâles (**Tableau 1**), son effet chez les femelles reste inconnu. Ainsi, nos études ont montré pour la première fois, l'absence d'amélioration des performances cardiaques lors du traitement par le landiolol au cours du sepsis chez les rates en âge de procréer, et des effets délétères ont même été observés. L'amélioration de la dysfonction myocardique après landiolol n'a été observée que chez les mâles et les femelles OVR, suggérant que l'effet bénéfique du landiolol est lié au sexe masculin, en l'absence de traitement hormonal par des hormones sexuelles femelles, et que les hormones

sexuelles femelles peuvent influencer l'efficacité du β -bloquant à prévenir la dysfonction myocardique.

Dans des modèles animaux septiques, l'amélioration de la fonction cardiaque après le traitement par β -bloquant est associée à une diminution de la réponse inflammatoire (Kimmoun et al., 2015 ; Wang et al., 2015). En plus, une activation de la voie adrénergique a été observée avec l'augmentation de l'expression de la protéine β 1-AR (Suzuki et al., 2005), et du transcrit de β -AR (Kimmoun et al., 2015). Dans nos études, la perfusion du landiolol au cours de sepsis a également diminué la réponse inflammatoire (**Figure 22**, étude 2), a activé la voie adrénergique chez les mâles (Figure 21, étude 2) et a activé l'influx de calcium chez les femelles OVR (**Figure 4**, étude 3). Ces résultats peuvent expliquer l'amélioration des performances cardiaques chez les mâles et les femelles OVR après le traitement par landiolol. En revanche, l'effet délétère observé chez les femelles après landiolol semblait lié à une augmentation de la réponse inflammatoire : augmentation du ratio AKT-phosphorylé/AKT (étude 1), de JAK2 (étude 3) et inactivation de la voie adrénergique et de l'efflux calcique (**Figure 4**, étude 3).

5. Conclusion

Ainsi, nos travaux ont montré que le landiolol améliore la dysfonction myocardique chez les mâles septiques en régulant négativement les voies de la réponse inflammatoire et de l'apoptose, en régulant positivement la voie β 1-adrénergique et en augmentant l'expression des gènes de l'influx calcique. En revanche, le landiolol a induit des effets délétères chez les femelles en activant l'inflammation, en inhibant la voie β 1-adrénergique et en diminuant les gènes de l'efflux calcique.

La protection de la dysfonction myocardique chez les femelles lors du sepsis est probablement liée aux hormones sexuelles femelles, qui interagissent avec les β -AR en régulant la voie adrénergique et l'inflammation, en particulier la voie JAK/STAT. En revanche, elles peuvent influencer l'efficacité du β -bloquant à prévenir la dysfonction myocardique.

Il apparaît qu'une attention particulière doit être apportée aux différences de réponse hémodynamique en fonction du statut hormonal des femmes au cours du sepsis. Le choix des patientes candidates à l'utilisation d'un traitement β -bloquant devrait ainsi tenir compte de ce statut hormonal.

Développement d'un modèle *in vitro* pour l'étude de la myocardite immuno-induite

1. Contexte

La myocardite immuno-induite par les immunothérapies anticancéreuses reste rare (moins de 2% des patients traités) mais possède un taux de mortalité d'environ 40%. Les mécanismes responsables de cette myocardite sont à ce jour très mal connus. L'IFN- γ , cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes T infiltrant le tissu cardiaque lors de cette réaction immunitaire inappropriée, semble associée à la physiopathologie de cette myocardite. A ce jour, le rôle de l'IFN- γ sur l'activité des cellules cardiaques est difficile à établir d'après la littérature car les résultats sont contradictoires. De plus, ce n'est que récemment avec l'arrivée du modèle de cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSC) différenciables en cellules cardiaques, que nous disposons de cellules en culture pour étudier ces effets. Les hiPSC apportent également l'opportunité d'un modèle cellulaire humain spécifique d'une pathologie car il peut être produit à partir des cellules des patients pour en étudier les mécanismes physiopathologiques.

Dans ces travaux, nous avons choisi d'étudier l'impact de l'IFN- γ sur les dérégulations transcriptionnelles de 2 types cellulaires cardiaques dérivés des hiPSC, les cardiomyocytes (hiPSC-CM) et les cellules endothéliales (hiPSC-CE). Nous disposons de clones hiPSC provenant d'une personne saine, de patients porteurs de mélanome ayant déclarés une myocardite induite par l'immunothérapie (anti-PD-1 et anti-CTLA-4) et de patients porteurs de mélanome n'ayant pas déclaré de myocardite après immunothérapie.

Nos objectifs étaient 1/ de documenter les effets transcriptionnels régulés par l'IFN- γ sur notre modèle cellulaire ; 2/ de comparer les réponses des hiPSC-CM et des hiPSC-CE à la stimulation par l'IFN- γ ; 3/ de rechercher une réponse à l'IFN- γ spécifique des cellules provenant des patients ayant déclaré une myocardite.

2. Matériel et méthodes

2.1. Obtention et maintenance des hiPSC

La génération des clones hiPSC a été réalisée par la plateforme de cellules souches du MMG, campus Timone (MaCS, Marseille). Les hiPSC sont maintenues dans du mTeSR™1 (85850, STEMCELL™ Technologies) sur des plaques recouvertes de Matrigel (354277, Corning) et passées tous les 5 à 7 jours en utilisant du Versene (15040-066, Gibco, Thermo Fisher Scientific). Toutes les cultures ont été testées une fois par mois pour les mycoplasmes en utilisant le kit MycoAlert Plus (Lonza).

La pluripotence des hiPSC a été évaluée par cytométrie en flux afin d'identifier le pourcentage de cellules positives avec les marqueurs intracellulaires : Oct3/4, Sox2 et Nanog en utilisant le kit d'analyse du facteur de transcription des cellules souches pluripotentes humaines (560589, BD Biosciences). Les cellules ont été analysées avec le cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences). L'analyse des données a été effectuée avec FlowJo v7.6.

2.2. Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes

Les hiPSC ont été dissociées avec StemPro Accutase (A1110501, Gibco) à 37 °C pendant 7 min, puis ensemencées sur des plaques 6 puits recouvertes de Matrigel à 2 à 2.5 millions de cellules vivantes dans du milieu mTeSR™1 supplémenté en RevitaCell™ (A2644501, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) (jour -2). Après 24h, le milieu a été remplacé par milieu mTeSR™1 sans RevitaCell (jour -1). Au jour 0, les cellules doivent atteindre plus de 95% de confluence avant de commencer le protocole de différenciation en utilisant le kit « STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation and Maintenance » (05010, STEMCELL™ Technologies) selon les instructions du fournisseur. Des battements spontanés ont été observés après 8 jours. Après 15 jours, une purification mécanique a été réalisée pour retirer les zones non différenciées.

La purification mécanique des hiPSC-CM a été remplacée par une purification métabolique. Les cardiomyocytes à jour 13 ont été cultivés dans du milieu RPMI 1640 sans glucose supplémenté en lactate 4 mM (L4263, Sigma-Aldrich) et Hespes 25 mM (Thermo Fisher Scientific) pendant 5 jours. Les cardiomyocytes sont capables de consommer le lactate pour vivre, au contraire des cellules non-cardiomyocytes.

2.3. Différenciation des hiPSC en cellules endothéliales

Les hiPSC ont été dissociées, puis ensemencées sur des plaques 6 puits recouvertes de Matrigel à 750 000 cellules vivantes dans du milieu mTeSR™1 supplémenté en RevitaCell (jour -1). Au jour 0 et au jour 1, le milieu a été remplacé par du milieu « STEMdiff™ Mesoderm Induction Medium » (05221, STEMCELL™ Technologies) pour induire la différenciation en cellule du mésoderme. Au jour 2, le milieu a été remplacé par du milieu STEMdiff™ APEL additionné de 50 ng/ml de VEGF-165 humain recombinant et 10 M/ml de SB431542 (05270, 78073, 72234, STEMCELL™ Technologies) pour la spécification en cellule endothéliale. Le milieu a été changé tous les 2 jours. Au jour 11, les cellules CD31⁺ ont été purifiées en utilisant le kit CD31 MicroBead (130-091-935, Miltenyi Biotec) selon les instructions du fournisseur. Les hiPSC-CE purifiées ont été cultivées dans du milieu MV2 (C-22022, Promocell) auquel ont été ajoutés 25 ng/ml de VEGF-165 humain recombinant.

2.4. Ensemencement des cellules et traitement à l'IFN-γ

Les hiPSC-CM au jour 20 de différenciation ont été dissociées, puis ensemencées dans des plaques 24 puits recouvertes de Matrigel (750 000 cellules/puits). Les cardiomyocytes à jour 25-30 ont été traités pendant 48h ou 72h avec l'IFN-γ 10 ng/ml (130-096-484, Miltenyi Biotec) dilué dans du milieu maintenance.

Les hiPSC-CE ont été ensemencées dans des plaques 24 puits recouvertes de gélatine à 0.1% (200 000 cellules/puits) dans du milieu de croissance de cellules endothéliales MV2 (PromoCell). Le lendemain, les cellules ont été traitées pendant 48h ou 72h avec l'IFN-γ 10 ng/ml dilué dans du MV2. Les traitements par IFN-γ ont été effectués sur des hiPSC-CE à P3.

2.5. Immunomarquage pour les marqueurs des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Les hiPSC-CM au jour 20 ont été dissociés, étalés sur des lames de labtek 8 chambres (Sarstedt) recouvertes de Matrigel et laissées adhérer pendant 5 jours. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (Electron Microscopy Services) dans du DPBS pendant 15 min à température ambiante (TA), perméabilisées avec 0.2% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) dans du DPBS pendant 15 min à TA, bloquées dans de l'albumine de sérum bovin à 2% (BSA, Sigma-Aldrich) dans du DPBS pendant 60 min à TA, et incubées avec des anticorps primaires : TNNT2 (monoclonal mouse IgG1, Thermo Fisher Scientific, MA5-12960, 1/200), SMA (monoclonal mouse IgG2a, Thermo Scientific, 14-9760-82, 1/50), Vimentin (polyclonal rabbit

IgG, PA5-27231, Thermo Scientific, 1/500), Ki67 (polyclonal rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific, PA5-16785, 1/500), MLC2a (monoclonal mouse IgG2b, Synaptic Systems, 311011, 1/200), MLC2v (polyclonal rabbit IgG, Proteintech, 10906-1-AP, 1/200) dans une solution de blocage pendant 3h à TA. Les cellules ont été lavées, puis colorées avec des anticorps secondaires couplés au fluorochrome : Alexa 594 Goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, A-11032, 1/1000), Alexa 488 Goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, A-11034, 1/10000) dans une solution de blocage pendant 1h à TA à l'obscurité. Les cellules ont été lavées et montées avec Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific).

Les hiPSC-CE ont été dissociées, étalées sur des lames labtek 8 chambres recouvertes de gélatine 0.1% dans du milieu MV2. De la même manière que pour les hiPSC-CM, après 2 jours, les cellules ont été incubées avec des anticorps : VE-cadhérine (monoclonal mouse IgG, Proteintech, 66804-1-Ig, 1/100), CD31 (polyclonal rabbit IgG, Proteintech, 11265-1-AP, 1/200), VWF (monoclonal mouse IgG1, Thermo Fisher Scientific, 1/100), Ki67 (polyclonal rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific, PA5-16785, 1/500).

Les images ont été acquises au microscope Zeiss Axio Observer, et analysées avec le logiciel Zen blue.

2.6. Cytométrie en flux pour les marqueurs des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Pour évaluer l'efficacité de la différenciation, les hiPSC-CM ont été fixés et perméabilisés avec un ensemble de tampons de fixation et de perméabilisation intracellulaires (Thermo Fisher Scientific, 88-8824) et incubés avec les anticorps TNNT2, MLC2a, MLC2v avec des ratios identiques à l'immunomarquage pendant 1h à TA. Les isotypes contrôles suivants ont été utilisés : IgG1 de souris (Thermo Fisher Scientific, MA1-10407), IgG de lapin (Thermo Fisher Scientific, 02-6102), IgG2b de souris (Thermo Fisher Scientific, 14-4732-82). Les cellules ont été lavées et incubées avec des anticorps secondaires couplés au fluorochrome 1/500 pendant 30 min : Alexa 488 Goat anti-mouse IgG1 (A-2121), Alexa 647 Goat anti-mouse IgG2b (A-21242), Alexa 647 Goat anti-rabbit IgG (A-21244), tous de chez Thermo Fisher Scientific.

Les hiPSC-CE ont été traitées de la même manière que les cardiomyocytes, mais incubées avec les anticorps CD31 et VE-cadhérine, avec les mêmes ratios que pour l'immunomarquage.

Les cellules ont été analysées sur le cytomètre BD LSR Fortessa X20 (BD Biosciences). Les données ont été analysées avec FlowJo v7.6.

2.7. Extraction des ARNs totaux

Nous avons suivi les instructions du protocole « RNeasy® Mini kit » (74104, QIAGEN). Après l'ajout du tampon de lyse (RLT + β -mercaptoéthanol), nous avons ajouté une étape de broyage avec des billes en verre VK05 et le broyeur Preycellys® Evolution (Precellys®). Le surnageant (cellules broyées + tampon de lyse) a été récupéré, 400 μ l de Trizol (Thermo Scientific) ont été ajoutés suivi d'une incubation de 5 min à TA, puis 150 μ l de chloroforme ont été ajoutés suivi d'une centrifugation de 15 min à 4 °C. Le Trizol augmente l'efficacité de la lyse cellulaire, et le chloroforme isole les ARNs totaux présents dans le surnageant. Après l'élution des ARNs totaux, nous les avons traités à la DNase (79254, QIAGEN) en suivant les instructions du fournisseur.

La qualité des ARNs a été confirmée avec le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) en utilisant les puces Agilent RNA 6000 Nano. Le RIN (RNA integrity number) variant de 8 à 10 indique une bonne intégrité des ARNs. Tous nos ARNs étaient de bonne qualité ($9.1 < \text{RIN} < 10$). La concentration des ARNs a été déterminée par absorbance à 260/280 nm sur un NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific) et également par Qubit RNA HSA Assay Kit (Q32852, Invitrogen).

2.8. Analyse transcriptomique

Principe générale des puces à ADN

Une puce à ADN est composée de puits contenant quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « sondes ». Ces sondes, présentes en excès au niveau des dépôts (spots), sont des fragments d'ADN, ou d'oligonucléotides, correspondant à des séquences exoniques connues et répertoriées dans des bases de données telles que NCBI-Entrez-nucleotide. L'hybridation d'une population d'ARNm marquée par fluorescence sur une puce, spécifique d'un échantillon biologique donné dans une condition donnée, permet de détecter et de quantifier les variations de niveau d'expression des gènes à l'échelle du génome. Chaque puits de la puce peut être hybridé avec des populations d'ARNm d'échantillons différents, les variations de niveau d'expression peuvent donc être comparées entre les échantillons.

Lame de verre Agilent ©

Trois puces SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K (Agilent Technologies®), comportant chacune huit zones d'hybridation, ont été utilisées. Chaque zone comporte 629 976 dépôts d'oligonucléotides (60 nucléotides) correspondant à 44 782 gènes transcrits dont la séquence est référencée dans la base de données Entrez-nucleotide du NCBI.

Protocole des puces à ADN

Principe général : pour réaliser le marquage, l'hybridation et l'acquisition des données, nous avons suivi le protocole « One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis » (V2_24-03-14) (Agilent Technologies®). L'expérience de microarray est basée sur le principe d'une hybridation non-compétitive, tous les échantillons ont été marqués avec le même fluorochrome.

Marquage, purification et quantification : une population d'ARN complémentaires (ARNc) marqués est synthétisée à partir des ARNs totaux extraits des échantillons. Une solution de « Spike » a été ajoutée aux échantillons : mélange d'ARN de séquences connues, s'hybridant à des dépôts précis présents sur les puces à ADN et servant de contrôle interne à chaque étape du protocole. 200 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc), par l'enzyme AffinityScript-RT (Agilent Technologies®). Une amplification des ARNc couplée avec le marquage Cyanine 3 (Cy-3), à partir des ADNc, est faite grâce à l'enzyme T7 RNA polymérase (Agilent Technologies®). Après une étape de purification sur colonne (RNeasy® Mini Kit protocol), la concentration d'ARNc obtenue et le taux d'incorporation de cyanine ont été quantifiés au NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer©).

Hybridation et acquisition des données : 600 ng d'ARNc ont été fragmentés puis utilisés pour l'hybridation. Les échantillons, analysés en triplicat, ont été hybridés sur trois lames de verre. Après 17h d'incubation en rotation à 65 °C, les lames de verre ont été lavées, séchées puis scannées sur un scanner « Agilent Microarray Scanner® ». La fluorescence a été mesurée après excitation à des longueurs d'onde allant de 550 à 610 nm. La visualisation et les intensités mesurées ont été récupérées à l'aide du logiciel « Feature Extraction® ». Les données brutes et les rapports de qualité (QC reports), évaluant la qualité du marquage, de l'hybridation et des lavages par rapport au Spike, ont été enregistrés.

2.9. Analyse bioinformatique de l'étude transcriptomique

Normalisation des données brutes

La librairie « AgiND », développée pour le diagnostic et la normalisation des puces Agilent, est chargée sur « R ». Cette normalisation diminue l'importance des variations artéfactuelles

inter- et intra-puces, pour rendre similaires les distributions d'intensité des puces et les comparer. Les valeurs d'intensité sont transformées en log2, pour obtenir des données symétriques et une distribution proche d'une loi normale puis normalisées par la méthode des quantiles.

Analyse statistique des données normalisées

Les données normalisées ont été filtrées afin de supprimer les sondes contrôles nécessaires pour valider l'hybridation puis d'éliminer le bruit de fond. Seuls les gènes exprimés au-dessus du bruit de fond dans 100% des échantillons ont été conservés, soit 33 766 sondes pour les CM et 31 687 sondes pour les CE. Le logiciel « TMeV » (Tigr MultiExperiment Viewer) a ensuite été utilisé pour effectuer les tests SAM (significance analysis of microarray). Cette méthode basée sur le test de Student permet d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les différents échantillons. Les p-valeurs empiriques ont été calculées après 10 000 permutations. Nous avons appliqué un false discovery rate (FDR) à 0%, 1% et 5%. Après chaque test SAM, un clustering hiérarchique basé sur la corrélation de Pearson a été réalisé sur les échantillons et sur les sondes.

Annotations fonctionnelles

L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec l'outil g:GOST, disponible sur g:profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>), qui permet une interprétation biologique de listes de gènes basée sur l'utilisation de termes "GO" (Gene Ontology) ainsi que des voies "KEGG" (Kyoto encyclopedia of genes and genomes). Un calcul d'enrichissement fonctionnel a été effectué avec le test exact de Fisher puis une correction des tests multiples avec la méthode de Benjamini-Hochberg permettant de sélectionner les termes et voies significatives ($p > 0.05$). Une seconde analyse a été réalisée en utilisant la base de données KEGG afin de visualiser les voies de signalisation dans lesquelles sont impliqués les gènes différentiellement exprimés en ne tenant compte que du nombre de gènes identifiés. Cytoscape a été utilisé pour dessiner le réseau de gènes dans les voies de signalisation régulées par l'IFN- γ et par la cardiotoxicité (<http://www.cytoscape.org>).

2.10. La PCR quantitative (q-PCR)

La synthèse de l'ADNc est réalisée en utilisant l'enzyme « SuperScript® VILO™ Master Mix » avec 1 μ g d'ARN dans 20 μ l de volume final selon les recommandations du fournisseur (11755050, Thermo Fisher Scientific). La q-PCR est réalisée en utilisant le « Power SYBR®

Green Master Mix » (4367659, Thermo Fisher Scientific) sur le système QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). Les séquences des amorces utilisées sont données dans le **Tableau 4**. La normalisation des valeurs est effectuée par rapport au gène ribosomal protein L32 (RPL32) et la valeur ΔC_T est utilisé pour l'analyse statistique.

Genes	Foward	Reverse
PD-L1	CCTGCAGGGCATTCCAGA	GTCCTTGGGAACCGTGACAG
HLA-B	CTGGAGAACGGGAAGGACAA	TCATGGTCAGAGATGGGGTG
HLA-DR	CCGATCACCAATGTACCTCCA	CGAAGCCACGTGACATTGAC
IL-1B	CAGCTACGAATCTCCGACCAC	GGCAGGGAACCAGCATCTTC
IL-1R	TCCAGTCACTAATTTCCAGAAGC	CCTGTACCAAAGCACAATGTCAA
IL-6	GTCCTGATCCAGTTCCTGCA	CAGGCTGGCATTGTGGTTG
IL-18	CCAAGGAAATCGGCCTCTAT	CCATACCTCTAGGCTGGCTATC
CXCL9	GGTGTTCTTTTCCTCTTGGG	GATAGTCCCTTGGTTGGTG
CX3CL1	ACCACGGTGACGAAATG	CTCCAAGATTGCGCGTTT
PTGS2	CAAATTGCTGGCAGGGTTG	ATCTGCCTGCTCTGGTCAAT
EDN1	GGAACACCTAAGACAAACCAGG	TTGCCTTTCAGCTTGGGATC
MDK	AAGGAGTTTGGAGCCGAC	CTTGGCGGACTTTGGTGC
THBS1	GACGGGTTTCATTAGAGTGG	AACCCTAGTCTACCACCAG
NLRC5	GCTCTGGTAGGCTGTGGG	ATCTGCAGCCTCCCCATT
NLRP3	ACTGCAAGCTTCATTAGAGTGG	AACCCTAGTCTACCACCAG
GBP5	CTCGGAAAGGAATACAGGCTG	GCCTGGTCAGTCTGTAAT
GBP6	AGTAAAGGCAAAAGAGGTCT	GCTACTGCCTTCTCTCTATC
TLR2	CGGCGTTCTCTCAGGTGA	GTCACCTAAGAGCTCCTGGGA
TLR3	GTATTGCCTGGTTTGTTAATTGG	AAGAGTTCAAAGGGGGGCACT
TLR4	TACAAAATCCCCGACAACCTCC	GCTGCCTAAATGCCTCAGGG
CASP1	TGCTGCTACAAAATCTGGGGT	TCTGGAGACTGTCGTGCAAG
CASP3	TGGAAGCGAATCAATGGACTCT	AACACCTTAACTACGCACTAC
CASP10	CCTCCCTAAGTTTCCTGGCA	CTGTTCTTCGGCTCAGCAT
FAS	GAACACTGTGACCCTTGACAC	GAAGACAAAGCCACCCCAAG
BCL2	GCCCTGTGGATGACTGAGTA	GGCCGTACAGTTCACAAAAG
JAK1	CAGCCCTGTGTTTTGGTATGC	TGACTCCAAAAGACCAGACGT

JAK2	TGGACTGTATGTACTTCGATGCA	TGACATTTTCTCGCTCGACAG
STAT1	GTTCAGTGAGAGCTCCCCG	GCATGGAAGTCAGGTTTCGC
STAT3	GAGGCGTCACTTTCACCTGG	TTTGTGTATGGTTCC
IFNGR1	TGATCTCTGTGGTAAGAAGTGCT	TCACAGACCACCTCC
IFNGR2	ATCCAACAGGTCAAAGGCCC	TGTGCCTGGACTTGTAACAGT
MYH6	CTGCGGCCAGATTCTTCAG	CCTTCTCTGACTTGCGGAGG
MYH7	GAGTCGGTGAAGGGCATGAG	GCTTGTCTACCAGGTCCTGC
CACNA1	CGAAGTAGGTGGAGTTGACCAC	GCAGGAGTACAAGAAGTGTGAGC
RPL32	TTGTGAAGCCCAAGATCG	CCGCCAGTTACGCTTAAT

Tableau 4 : Liste des primers.

2.11. Cytométrie en flux pour les marqueurs membranaires liés à l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Après le traitement à l'IFN- γ , les hiPSC-CM et les hiPSC-CE ont été dissociés et incubés avec des anticorps directement conjugués à un fluorochrome : anti-MHC-I, anti-MHC-II et anti-PD-L1 ou avec les isotypes contrôles comme dans le **Tableau 5**. Les anticorps spécifiques des types cellulaires (anti-TNNT2 et anti-CD31) ont été utilisés afin d'identifier respectivement les hiPSC-CM et hiPSC-CE. Tous les anticorps proviennent de Miltenyi Biotec.

Anticorps	Fluorochrome	Référence
Anti-TNNT2	APC	130-120-403
Anti-CD31	VioBright 515	130-117-232
Anti-HLA-ABC (Anti-MHC-I)	APC-Vio770	130-120-570
Anti-HLA-DR (Anti-MHC-II)	VioGreen	130-111-948
CD274 (B7-H1) (Anti-PD-L1)	PE-Vio615	130-122-817
REA Control (S)	APC-Vio770	130-113-435
REA Control (S)	VioGreen	130-113-444
REA Control (S)	APC-Vio770	130-113-435
REA Control (I)	APC	130-120-709
REA Control (S)	VioBright 515	130-113-445

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour l'évaluation de l'expression des protéines membranaires liées à l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE.

2.12. Analyse des caractéristiques contractiles des cardiomyocytes

Après la stimulation par l'IFN- γ , la contraction des hiPSC-CM a été enregistrée pendant 1 min à 38 images/sec dans une chambre à 37°C, 5% CO₂, fabriquée par la plateforme d'imagerie de l'IBDM pour le microscope Zeiss Axio. Le nombre de battements, les arythmies ainsi que les caractéristiques contractiles des hiPSC-CM ont été mesurés en utilisant le plugin « MUSCLEMOTION » sur Image J. Cet outil détermine les changements dynamiques de l'intensité des pixels entre les images pour une mesure relative du mouvement pendant la contraction et la relaxation des hiPSC-CM (**Figure 23**).

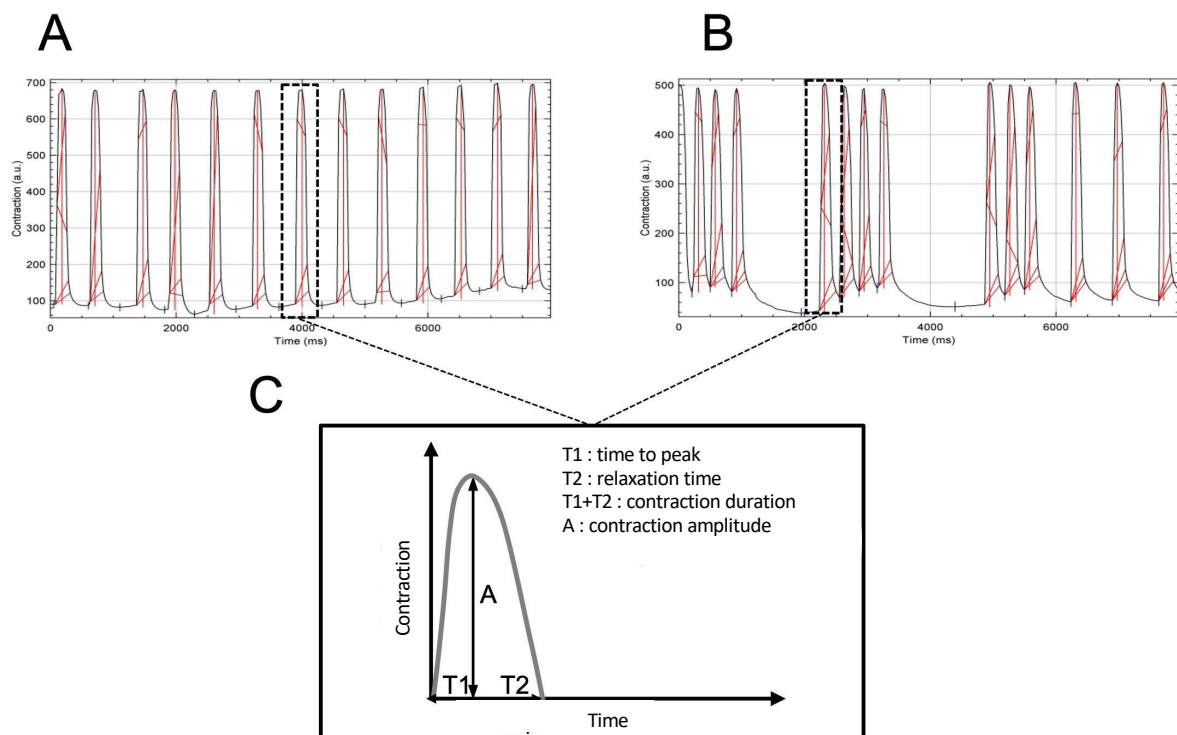


Figure 23 : Analyse des propriétés contractiles des hiPSC-CM. Profils représentatifs d'une contraction régulière (A) et d'arythmie (B) obtenus en utilisant l'outil « MUSCLEMOTION » d'Image J. Chaque pic représente un battement. (C) Les principaux paramètres d'un battement analysés.

2.13. La prolifération des cellules endothéliales

Les hiPSC-CE ont été étalées sur des plaques 96 puits à 5 000 cellules/puits dans 100 μ l du milieu MV2. Après 48h de traitement à l'IFN- γ , le milieu neuf supplémenté avec 10% de réactif du kit Deep Blue Cell Viability™ (424701, Biolegend) a été changé pour chaque puits, suivis d'une incubation à 37°C pendant 1h. La fluorescence a été mesurée sur le lecteur de plaques VICTOR Nino (PerkinElmer) avec une excitation de 530 nm et une émission de 580 nm.

2.14. Analyse statistique

Les différences significatives entre les groupes sont calculées en utilisant le test ANOVA à 2 facteurs, suivi en cas de significativité, d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Sidak, à l'aide du logiciel Graphpad Prism (Graphpad Prism 9.0). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ déviation standard (SD) comme indiqué sur chaque figure. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Mise en place du modèle *in vitro* de cellules pluripotentes induites

3.1.1. hiPSC-CM (human induced Pluripotent Stem Cell-CardioMyocyte)

Nous utilisons les protocoles et les milieux développés par la société "StemCell™ Technologies" pour différencier et maintenir les hiPSC-CM en culture (**Figure 24**). Les cultures ont été purifiées mécaniquement afin d'éliminer les cellules non différenciées en cardiomyocytes. Pour caractériser les hiPSC-CM obtenues, nous avons quantifié le niveau d'expression de la troponine T2 (TNNT2) et de deux isoformes de la chaîne légère de la myosine MLC2a et MLC2v par cytométrie. Les cultures sont composées de plus de 90% de cellules TNNT2⁺, MLC2a⁺ et d'environ 50% de cellules MLC2v⁺ (**Figure 25**). Les images d'immunomarquage montrent une morphologie plutôt allongée et organisée en sarcomères exprimant les marqueurs spécifiques TNNT2, MLC2a, et MLC2v (**Figure 25**). La très faible proportion de cellules Ki67⁺ (marqueur de prolifération) observée révèle que ces cellules ne prolifèrent que très peu, ce qui est en accord avec le degré de maturation attendu (**Figure 25**).

3.1.2. hiPSC-CE (human induced Pluripotent Stem Cell-Cellule Endothéliale)

Nous avons également mis au point la différenciation des hiPSC en cellules endothéliales (**Figure 1**). La culture a également été purifiée grâce à des billes magnétiques afin d'éliminer les cellules non différenciées en cellules endothéliales et la caractérisation a été réalisée par cytométrie en quantifiant le niveau d'expression des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales : platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31/PECAM1) et vascular

endothelial cadherin (VE-cadhérine). Les cultures étaient composées de 90% de cellules CD31⁺ et VE-cadhérine⁺ (**Figure 26**). En immunomarquage, nous avons retrouvé l'expression de ces marqueurs à la membrane, ainsi que celle du facteur de von Willebrand (vWF) dans le cytoplasme. Le fort taux de cellules Ki67⁺ révèle que ces cellules sont majoritairement prolifératives (**Figure 26**).

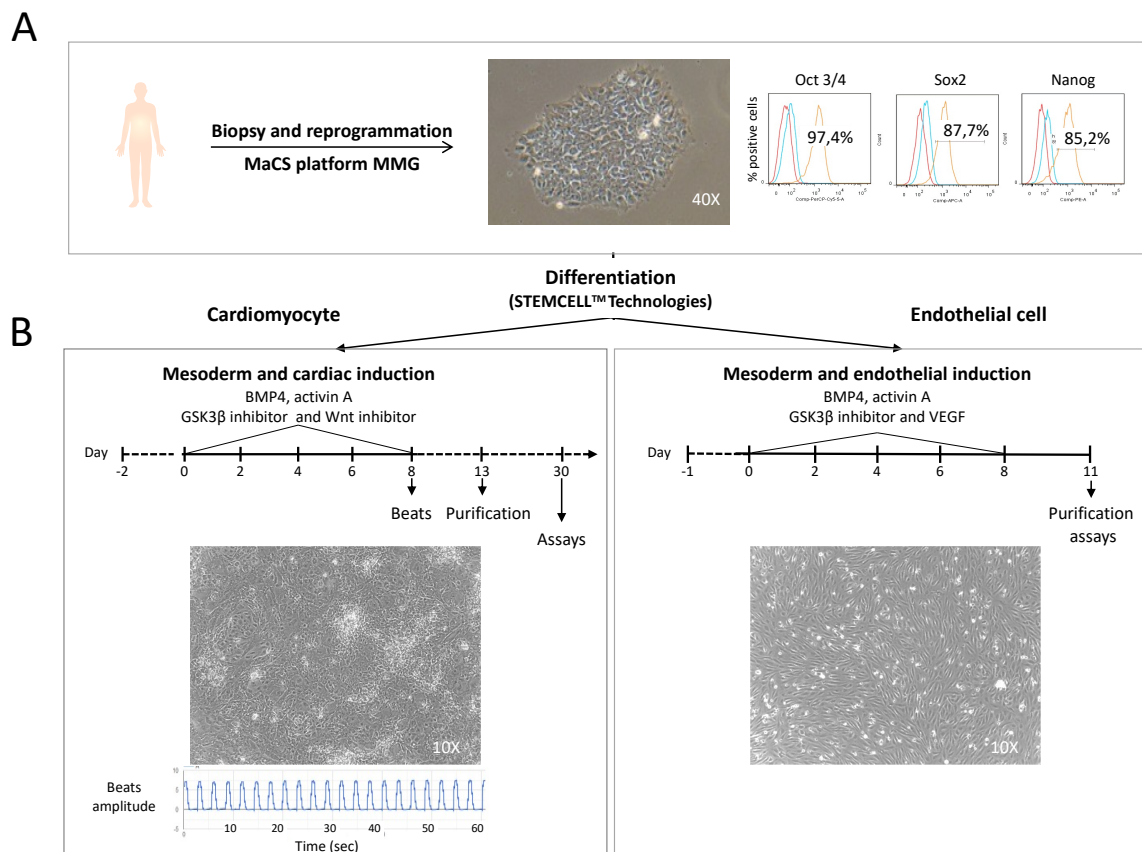


Figure 24 : Différenciation et caractérisation des cellules souches pluripotentes humaines induites. (A) Les hiPSC ont été générées sur la plateforme MaCS, leur morphologie ainsi que l'expression des trois marqueurs spécifiques des hiPSC (Oct3/4, Sox2, et Nanog) ont été vérifiées selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes). (B) Étapes de la différenciation des hiPSC en hiPSC-CM (human induced Pluripotent Stem Cell-CardioMyocyte) et hiPSC-CE (human induced Pluripotent Stem Cell-Cellule Endothéliale). A gauche, image représentative de la morphologie des hiPSC-CM qui présentaient des battements spontanés (21 bpm). A droite, image représentative de la morphologie des hiPSC-CE au passage 3.

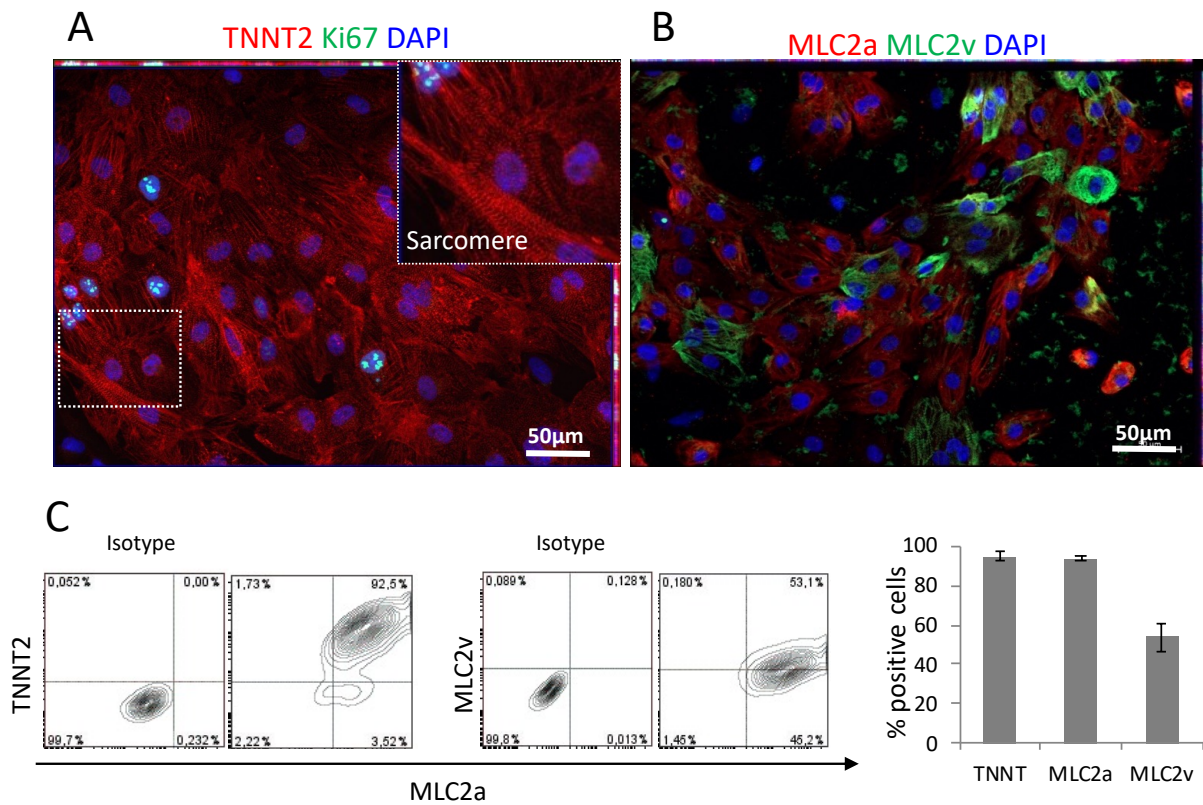


Figure 25 : Caractérisation des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines induites. (A) Immunomarquage montrant que la majorité des cellules expriment la troponine T2 (TNNT2), marqueur spécifique des sarcomères des cardiomyocyte, et que peu de cellules expriment le marqueur de prolifération Ki67. (B) Immunomarquage montrant la proportion de cardiomyocytes exprimant deux isoformes de la chaîne légère de la myosine, de type ventriculaire ou auriculaire (MLC2v et MLC2a) (C) Caractérisation en cytométrie d'une culture représentative, montrant la présence de 90% de cellules TNNT2⁺ et MLC2a⁺ et de 50% de cellules MLC2v⁺ (n = 3 différenciations indépendantes).

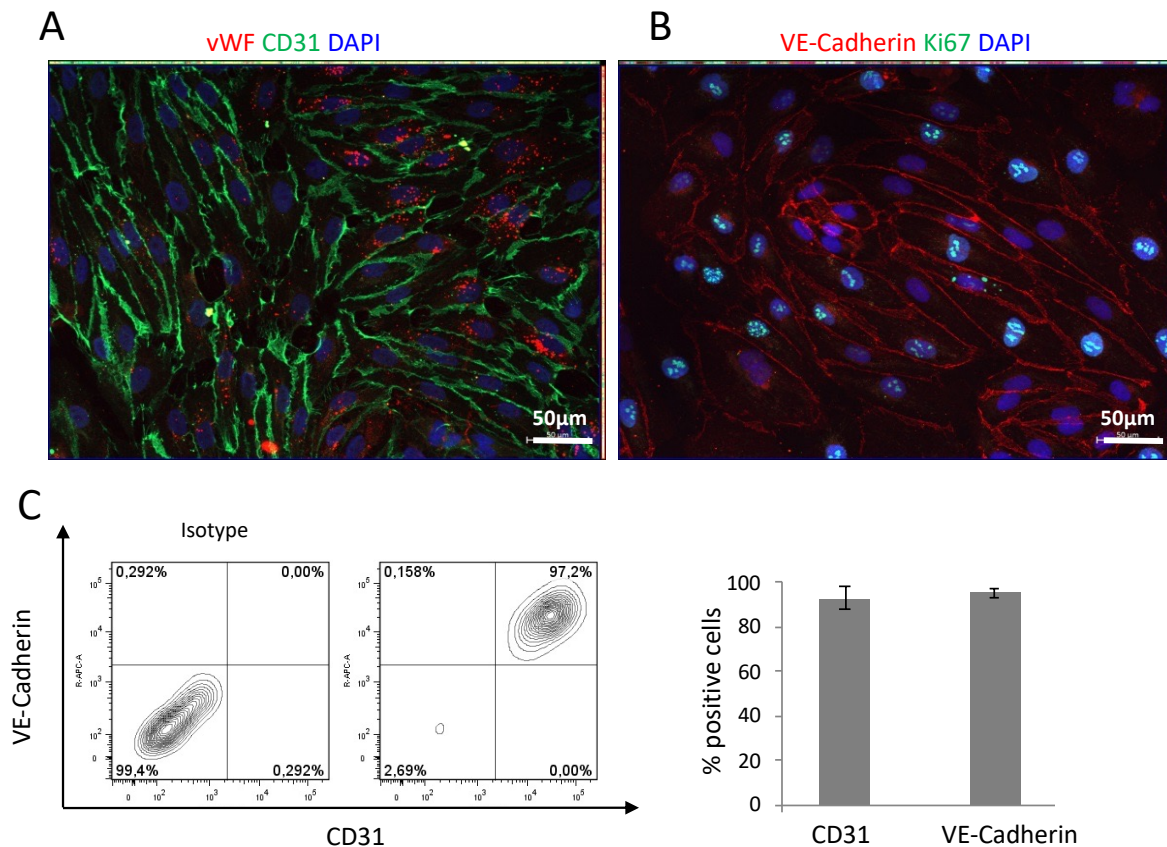


Figure 26 : Caractérisation des cellules endothéliales dérivées de cellules souches pluripotentes humaines induites. (A) Immunomarquages montrant que la majorité des cellules expriment platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31/PECAM1), le facteur de von Willebrand (vWF). **(B)** vascular endothelial cadherin (VE-Cadhérine) et Ki67. **(C)** Caractérisation en cytométrie d'une culture représentative, montrant la présence de 90% de cellules CD31⁺ et VE-Cadhérine⁺ (n = 3 différenciations indépendantes).

3.2. Identification des gènes différentiellement exprimés et des voies de signalisation associées dans les cellules cardiaques dérivées d'hiPSC stimulées par l'IFN- γ

Ce travail a été réalisé par S. Conte que j'ai encadrée techniquement au cours de son stage de M2 en 2020.

Pour cette étude, nous avons utilisé deux clones hiPSC : un dérivé d'une personne saine (PS) et un établi à partir d'un patient porteur de mélanome ayant déclaré une myocardite après traitement par ICI (anti-PD-1/anti-CTLA-4) (PCC). Des hiPSC-CM et des hiPSC-CE ont été générées et stimulées par 10 ng/ml d'IFN- γ pendant 72h. La dose et la durée du traitement ont été choisies afin de recréer une condition inflammatoire chronique *in vitro* comme décrit dans la littérature (Cosper et al., 2012 ; Didié et al., 2017 ; Grinnemo et al., 2019). De plus, cette

dose d'IFN- γ permet d'augmenter l'expression de PD-L1 dans les cellules endothéliales vasculaires de souris (EPPIHIMER et al., 2002).

Huit groupes d'échantillons (3 différenciations indépendantes) ont été comparés dans une analyse transcriptomique par microarrays : 1) des hiPSC-CM dérivés du clone PS non stimulés (PS-CM-Ctrl) et 2) stimulés par l'IFN- γ (PS-CM-IFN) ; 3) des hiPSC-CE dérivées du clone PS non stimulées (PS-CE-Ctrl) et 4) stimulées à l'IFN- γ (PS-CE-IFN) ; 5) des hiPSC-CM dérivés du clone PCC non stimulés (PCC-CM-Ctrl) et 6) stimulés à l'IFN- γ (PCC-CM-IFN) ; 7) des hiPSC-CE issues du PCC non stimulées (PCC-CE-Ctrl) et 8) stimulées à l'IFN- γ (PCC-CE-IFN) (**Figure 27**).

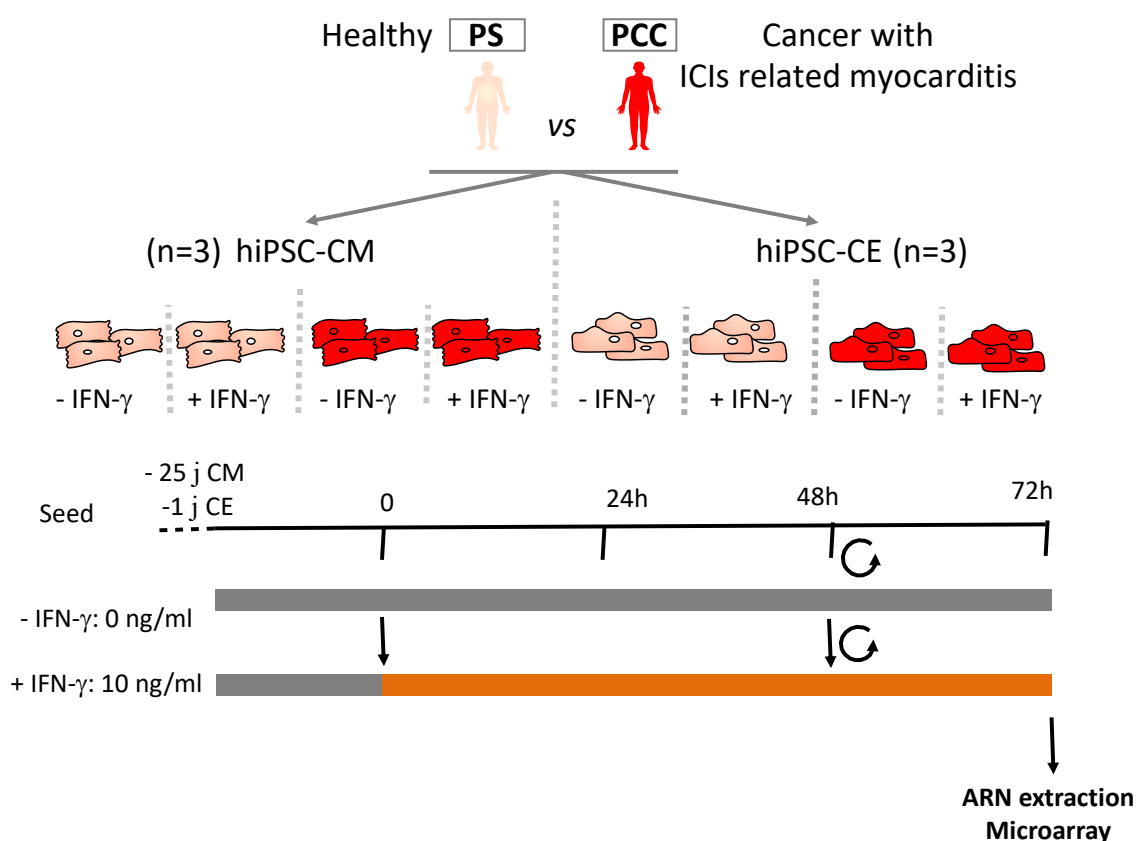


Figure 27 : Plan expérimental ayant servi à générer les échantillons pour l'analyse transcriptomique. (A) Deux clones de cellules hiPSC ont été utilisés : un provenant d'une personne saine (PS) et un provenant d'un patient porteur de mélanome ayant présenté une myocardite induite par ICIs (anti-PD-1 et anti-CTLA-4) (PCC). A partir des clones de cellules hiPSC, 3 différenciations indépendantes ont été réalisées pour produire les différents échantillons : hiPSC-CM et hiPSC-CE, stimulées ou non par 10 ng/ml d'IFN- γ pendant 72h. (B) Protocole du traitement des hiPSC différenciées par l'IFN- γ . Adapté du rapport de M2 de S. Conte.

Deux tests SAM multi-classes ont été effectués, le premier afin de comparer les 12 échantillons de hiPSC-CM entre eux, et le second pour comparer les 12 échantillons de hiPSC-CE entre eux. Dans les hiPSC-CM, 789, 3 774 et 7 901 gènes ont été identifiés différenciellement exprimés entre les 12 échantillons avec des FDR appliqués à 0%, 1% et 5% respectivement (**Tableau 1**). Dans les hiPSC-CE, 2 210, 6 788 et 11 341 gènes ont été identifiés différenciellement exprimés entre les 12 échantillons, avec des FDR appliqués à 0%, 1% et 5% respectivement (**Tableau 1**).

FDR	Nombre de sondes (Nombre de gènes)	
	hiPSC-CM	hiPSC-CE
0%	1 029 (789)	2 885 (2 210)
1%	4 716 (3 774)	8 783 (6 788)
5%	10 043 (7 901)	15 058 (11 341)

Tableau 6 : Nombre de sondes et gènes différenciellement exprimés après les analyses SAM multi-classes, dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE stimulés par l'IFN- γ avec des FDR à 0%, 1% et 5%. Les hiPSC-CE montrent beaucoup plus de régulations après stimulation à l'IFN- γ que les hiPSC-CM, quel que soit le false discovery rate (FDR).

Pour chacune des analyses statistiques, un clustering hiérarchique à deux dimensions, basé sur la corrélation de Pearson, a été effectué afin de regrouper d'une part les échantillons et, d'autre part les sondes, pour les gènes ayant le même profil d'expression.

3.2.1. Gènes différenciellement exprimés dans les hiPSC-CM

Quatre groupes d'échantillons ont été comparés : PS-CM-Ctrl ; PS-CM-IFN ; PCC-CM-Ctrl ; PCC-CM-IFN. Le test SAM multi-class permet d'identifier 1 029 sondes représentant 789 gènes différenciellement exprimés avec un FDR 0%. D'après le clustering hiérarchique, tous nos échantillons sont correctement classés, les 4 conditions sont distinguables (**Figure 28**). Notons que les échantillons contrôles (PS-CM-Ctrl et PCC-CM-Ctrl) sont regroupés ensemble, tout comme les échantillons stimulés (PS-CM-IFN et PCC-CM-IFN). Les sondes sont organisées en 4 clusters, permettant d'observer 4 types de réponses des hiPSC-CM. Les clusters 1 et 3 regroupent respectivement 6 gènes sous-exprimés et 255 gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CM stimulés par l'IFN- γ (qu'ils proviennent de la PS ou du PCC). Les clusters 2 et 4 regroupent respectivement 257 gènes sur-exprimés et 274 gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CM provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) (**Figure 28A**).

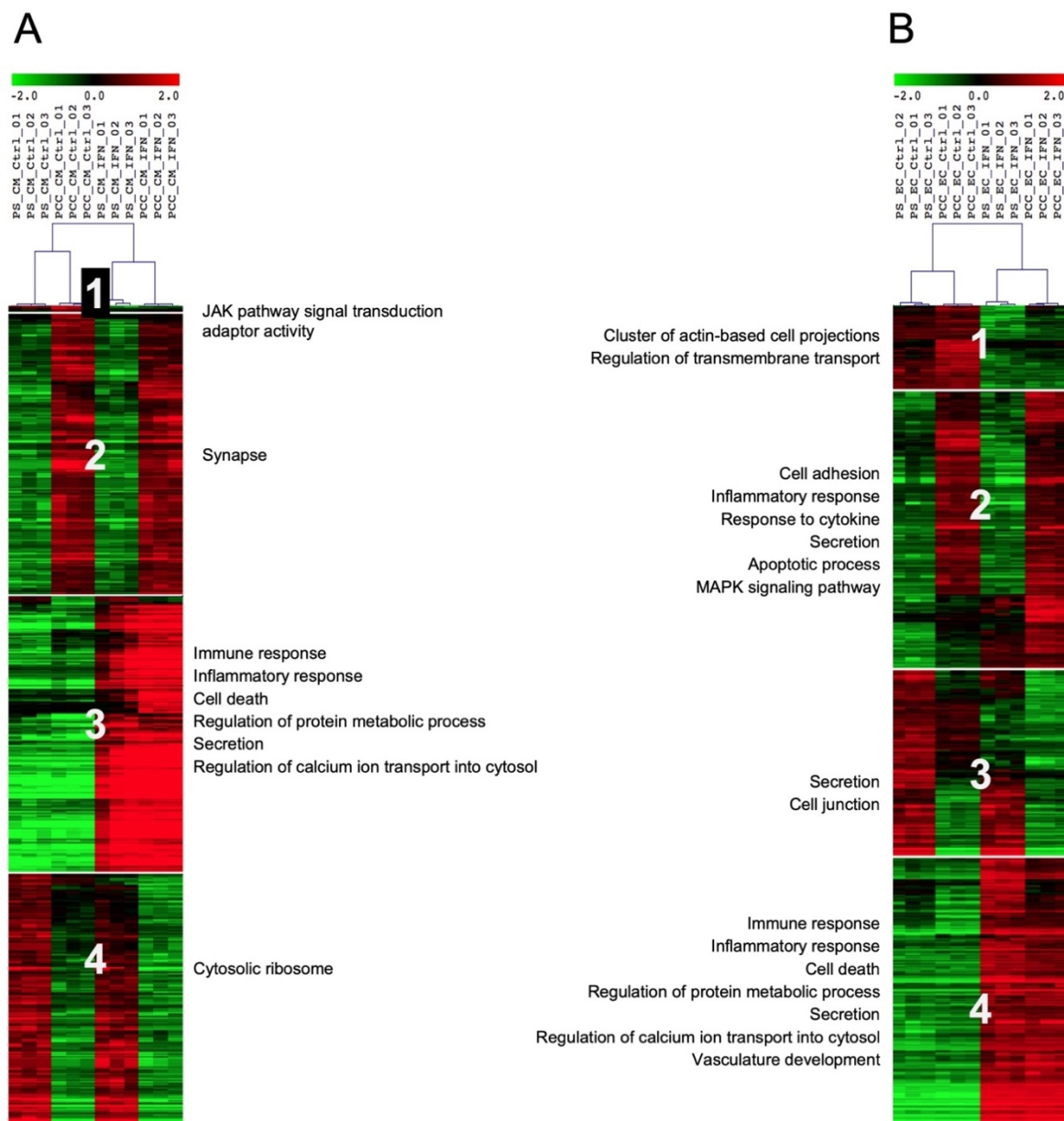


Figure 28 : Profils d'expression des gènes dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE stimulés par l'IFN- γ . Un clustering hiérarchique a été réalisé après une analyse SAM multi-classes, 10 000 permutations avec un FDR à 0% dans les hiPSC-CM (A) et dans les hiPSC-CE (B). Quatre clusters regroupent 4 groupes de gènes : les gènes sous-exprimés et les gènes sur-exprimés par la stimulation à l'IFN- γ (qu'ils proviennent de la PS ou du PCC) ont été regroupés dans les clusters 1 et 3 des hiPSC-CM et dans les clusters 1 et 4 des hiPSC-CE ; les gènes sur-exprimés et les gènes sous-exprimés provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) ont été regroupés respectivement dans les clusters 2 et 4 des hiPSC-CM et dans les clusters 2 et 3 des hiPSC-CE. Les principaux processus biologiques annotés avec g:profiler sont indiqués.

3.2.2. Gènes différentiellement exprimés dans les hiPSC-CE

Quatre groupes d'échantillons ont été comparés : PS-CE-Ctrl ; PS-CE-IFN ; PCC-CE-Ctrl ; PCC-CE-Ctrl. Le test SAM a permis d'identifier 2 885 sondes qui représentent 2 210 gènes

différentiellement exprimés avec un FDR 0%. Les échantillons sont correctement classés, les 4 conditions analysées sont distinguables, et classés comme les hiPSC-CM : les échantillons contrôles (PS-CE-Ctrl et PCC-CE-Ctrl) sont regroupés ensemble, et les échantillons stimulés (PS-CE-IFN et PCC-CE-IFN) également (**Figure 28B**). Les sondes correspondant aux gènes différentiellement exprimés sont organisées en 4 clusters. Les clusters 1 et 4 regroupent respectivement 269 gènes sous-exprimés et 698 gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CE stimulées par l'IFN- γ (qu'ils proviennent de la PS ou du PCC). Les clusters 2 et 3 regroupent respectivement 519 gènes sous-exprimés et 748 gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CE provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) (**Figure 28B**).

3.3.3. Identification des processus biologiques et voies de signalisation

Nous avons recherché les processus biologiques et les voies de signalisation associées aux gènes dérégulés par la stimulation à l'IFN- γ d'une part, et par la cardiotoxicité d'autre part. Tous les gènes différentiellement exprimés dans les 2 analyses SAM multi-classes ont été utilisés. Nous avons choisi un FDR de 0% pour ces deux analyses du fait du grand nombre de gènes différentiellement exprimés dans cette condition et utilisé g:profiler afin d'annoter fonctionnellement les différentes listes de gènes. Les termes GO et les voies KEGG pour lesquels un enrichissement a été retrouvé après avoir effectué un test de correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil < 0.05 ont été identifiés.

a) Annotations fonctionnelles dans les hiPSC-CM

Les gènes différentiellement exprimés par la stimulation à l'IFN- γ : on ne retrouve pour le cluster 1 que le gène suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) sous-exprimé suite à la stimulation par l'IFN- γ , associé au terme GO JAK pathway signal transduction adaptor activity. Les termes GO du cluster 3 représentent les gènes sur-exprimés suite à la stimulation par l'IFN- γ ; ils sont associés à de nombreux termes GO. Les gènes sont principalement associés à la réponse immunitaire (126 gènes) et inflammatoire (30 gènes), la mort cellulaire (47 gènes), la régulation métabolique (51 gènes) et la sécrétion (33 gènes) (**Figure 28A, Tableau 7**). Plusieurs voies KEGG ont été retrouvées comme NOD-like, Toll-like, NF- κ B, JAK/STAT, ou encore la présentation d'antigène et la voie PD-1/PD-L1 (**Tableau 7**).

Les gènes différentiellement exprimés dans le PCC comparé à la PS : le cluster 2, représentant les gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CM provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) est composé de gènes associés aux processus synaptiques, comme des gènes codant des échangeurs membranaires impliqués dans la régulation de la contraction musculaire (28

gènes). Le cluster 4, représentant les gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CM provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ), ne révèle que le terme GO associé à l'activité ribosomique avec 6 gènes impliqués dans la régulation de la traduction des protéines (Cytosolic ribosome) (**Figure 28A, Tableau 8**).

b) Annotations fonctionnelles dans les hiPSC-CE

Les gènes différentiellement exprimés par la stimulation à l'IFN- γ : les gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CE par l'IFN- γ sont impliqués dans la régulation du transport membranaire et le complexe actine/myosine (cluster 1, 18 gènes) (**Figure 28B, Tableau 7**). Le cluster 4, représentant les gènes sur-exprimés par l'IFN- γ est associé à de nombreux termes GO (**Figure 28B, Tableau 7**). Les gènes sont principalement associés à la réponse immunitaire (210 gènes), la réponse inflammatoire (68 gènes), la mort cellulaire (114 gènes), la sécrétion (82 gènes). Il est particulièrement intéressant de trouver également des gènes impliqués dans le développement vasculaire (42 gènes). De même, de nombreuses voies de signalisation ont été retrouvées comme NOD-like, Toll-like, NF- κ B, JAK/STAT, ou encore la présentation d'antigène et la voie PD-1/PD-L1 (**Tableau 7**).

Les gènes différentiellement exprimés dans le PCC comparé à la PS : les gènes du cluster 2 sur-exprimés dans les hiPSC-CE provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) sont impliqués à l'adhésion cellulaire (70 gènes), la sécrétion (67 gènes), la réponse inflammatoire (41 gènes) et l'apoptose (73 gènes) (**Figure 28B, Tableau 8**). Les gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CE provenant du PCC (qu'ils aient été ou non stimulés par l'IFN- γ) sont associées à la sécrétion (54 gènes) et la jonction cellulaire (54 gènes) (**Figure 28B, Tableau 8**).

ID	Description	Number of gene		P-value	
		CM	CE	CM	CE
Down regulation					
GO:0008269	JAK pathway signal transduction adaptor activity	1	0	6.8 E-03	ND
GO:0034762	regulation of transmembrane transport	0	18	ND	3.8 E-02
GO:0098862	cluster of actin-based cell projections	0	7	ND	2.6 E-02
Up regulation					
GO:0006955	immune repose	126	156	1.2 E-62	2.1 E-55
GO:0045087	innate immune response	95	139	7.6 E-64	2.1 E-54
GO:0002250	adaptive immune response	41	65	7.7 E-18	1.2 E-15
GO:0034097	response to cytokine	91	149	9.6 E-52	6.3 E-52
GO:0034341	response to interferon-gamma	49	67	7.5 E-51	2.5 E-50
GO:0006954	inflammatory response	30	68	3.8 E-08	2.6 E-14
GO:0008219	cell death	47	114	0.9 E-04	7.1 E-08

GO:0006915	apoptotic process	43	104	9.2 E-05	5.8 E-08
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	51	127	0.2 E-02	1.5 E-05
GO:0046903	secretion	33	82	0.5 E-02	5.2 E-05
GO:0050663	cytokine secretion	18	37	2.0 E-08	1.7 E-13
GO:0008009	chemokine activity	5	13	0.3 E-02	1.37 E-07
GO:0061702	inflammasome complex	4	5	1.1 E-04	4.5 E-04
GO:0010522	regulation of calcium ion transport into cytosol	6	10	9.2 E-05	0.8 E-02
GO:0001944	vasculature development	0	42	ND	0.2 E-02
KEGG:04612	Antigen processing and presentation	22	28	6.9 E-22	3.1 E-20
KEGG:05416	Viral myocarditis	15	19	5.3 E-14	2.0 E-12
KEGG:04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	17	22	4.8 E-10	2.4 E-07
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint					
KEGG:05235	pathway in cancer	6	0	0.7 E-02	ND
KEGG:04621	NOD-like receptor signaling pathway	22	33	2.3 E-13	5.1 E-13
KEGG:04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	13	33	0.2 E-02	1.9 E-07
KEGG:04668	TNF signaling pathway	6	22	0.02	3.0 E-09
KEGG:04064	NF- κ B B signaling pathway	7	15	0.3 E-02	4.8 E-05
KEGG:04620	Toll-like receptor signaling pathway	9	11	0.1 E-04	0.01
KEGG:04630	JAK/STAT signaling pathway	0	17	ND	0.9 E-03

Tableau 7 : Annotations fonctionnelles pour les gènes différentiellement exprimés par la stimulation à l'IFN- γ dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE. Les termes GO et les voies KEGG identifiés dans g:profiler avec $p < 0.05$. GO : Gene Ontology, KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes, ND : non disponible.

ID	Description	Numbre of gene		P-value	
		CM	CE	CM	CE
Down regulation					
GO:0022626	cytosolic ribosome	6	9	1.7 E-02	1.2 E-02
GO:0046903	secretion	0	54	ND	3.0 E-02
GO:0030054	cell junction	0	40	ND	3.4 E-02
Up regulation					
GO:0045202	synapse	28	0	1.0 E-02	ND
GO:0002684	positive regulation of immune system process	0	50	ND	2.1 E-02
GO:0034097	response to cytokine	0	57	ND	2.7 E-03
GO:0006954	inflammatory response	0	41	ND	2.9 E-03
GO:0007155	cell adhesion	0	70	ND	1.8 E-04
GO:0046903	secretion	0	67	ND	1.5 E-02
GO:0043270	positive regulation of ion transport	0	19	ND	9.3E-03
GO:0006915	apoptotic process	0	73	ND	3.9E-02
KEGG:04010	MAPK signaling pathway	0	20	ND	3.7 E-02

Tableau 8 : Annotations fonctionnelles pour les gènes différentiellement exprimés dans le PCC comparé à la PS dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE. Les termes GO et les voies KEGG identifiés dans g:profiler avec $p < 0.05$. GO : Gene Ontology, KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes, ND : non disponible.

3.2.4. Identification des processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-CE

Pour déterminer la réponse commune et la réponse spécifique des hiPSC-CM et celle des hiPSC-CE à la stimulation par l'IFN- γ d'une part, et à la cardiotoxicité d'autre part, 4 diagrammes de Venn ont été réalisés avec une partie des listes de gènes différentiellement exprimés provenant des deux analyses SAM-multiclasses.

Les analyses fonctionnelles pour les gènes différentiellement exprimés entre les deux types cellulaires ont été effectuées avec g:profiler. Les termes GO et les voies KEGG enrichis significativement ont été identifiés par un test de correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil < 0.05 .

a) Gènes sous-exprimés suite à la stimulation par l'IFN- γ

Les gènes sous-exprimés par l'IFN- γ identifiés dans les hiPSC-CM (cluster 1) ont été comparés avec ceux des hiPSC-CE (cluster 1). Sur un total de 273 gènes, 4 sont sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM (67% de gènes dans les hiPSC-CM), 267 sont sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CE (99% de gènes dans les hiPSC-CE), et seulement 2 gènes sont communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE (loc101930246 (ARN non codant) et le TNF receptor superfamily, TNFRSF10D) (**Figure 29A**). Les gènes sous-exprimés de manière spécifique dans les hiPSC-CM sont associés à la transduction du signal (JAK pathway signal transduction adaptor activity) ; dans les hiPSC-CE, on retrouve ceux associés au cytosquelette d'actine/myosine (cluster of actin-based cell projections) (**Figure 29B**).

b) Gènes sur-exprimés suite à la stimulation par l'IFN- γ

Les gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CM (cluster 3) et dans les hiPSC-CE (cluster 4) par l'IFN- γ ont été comparés. Sur un total de 764 gènes, 66 sont sur-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM (26% de gènes dans les hiPSC-CM), 510 sont sur-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CE (73% de gènes dans les hiPSC-CE) et finalement 188 sur-exprimés à la fois dans les hiPSC-CM et les hiPSC-CE (**Figure 29A**).

Les gènes communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE sur-exprimés par l'IFN- γ sont impliqués dans la réponse immunitaire, la réponse aux cytokines, la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, la régulation métabolique, la sécrétion, avec les voies NOD-like (CASP1/4/5, guanylate binding protein (GBP) 1/3/4/5, purinergic receptor (P2RX7), gasdermin D, (GSDMD)), Toll-like (TLR3, MYD88), l'interaction cytokine-cytokine (TNFSF10/13B,

CXCL9/10/11), TNF (CASP10, IL-15), JAK/STAT (STAT1/2, SOCS1). Par ailleurs, on retrouve de manière attendue des gènes associés à la voie PD-1/PD-L1 (PD-L1), à la présentation d'antigène (HLA-A/B/C/DRA) et à l'adhésion cellulaire (ICAM1) (**Figure 29, B-C**).

On n'a retrouvé aucun processus spécifique associé aux gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CM stimulés par l'IFN- γ , mais certains gènes dans les processus communs avec les hiPSC-CE ont été identifiés spécifiquement dans les hiPSC-CM. Par exemple, les gènes codant pour la chemokine C-C motif chemokine ligant 21 (CCL21), ou la protéine TNF receptor superfamily member 5 (CD40) de la voie NF- κ B (**Figure 29, B-C**).

Dans les hiPSC-CE, comme dans les hiPSC-CM, la plupart des processus retrouvés sont communs aux 2 types cellulaires, mais plusieurs gènes dans ces processus ont été identifiés spécifiquement dans les hiPSC-CE. Il s'agit par exemple de IL-1B, pannexin 1 (PANX1), AIM2 dans la voie NOD-like, C-X3-C motif chemokine ligand 1 (CX3CL1), CXCL2/3, CXCR3 dans la voie de cytokine-cytokine, EDN1, Fas cell surface death receptor (FAS), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) dans la voie TNF et JAK2, STAT3/5A, SOCS3 dans la voie JAK/STAT (**Figure 29, B-C**). De plus, il ressort de notre analyse des gènes impliqués dans des processus spécifiques des hiPSC-CE, en particulier des gènes impliqués dans le développement et la contraction du muscle vasculaire (thrombospondin 1 (THBS1), EDN1, PTGS2, bone morphogenetic protein 4 (BMP4), midkine (MDK)) et dans l'homéostasie du calcium (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit (CACNA2D1), P2RX4) (**Figure 29B**).

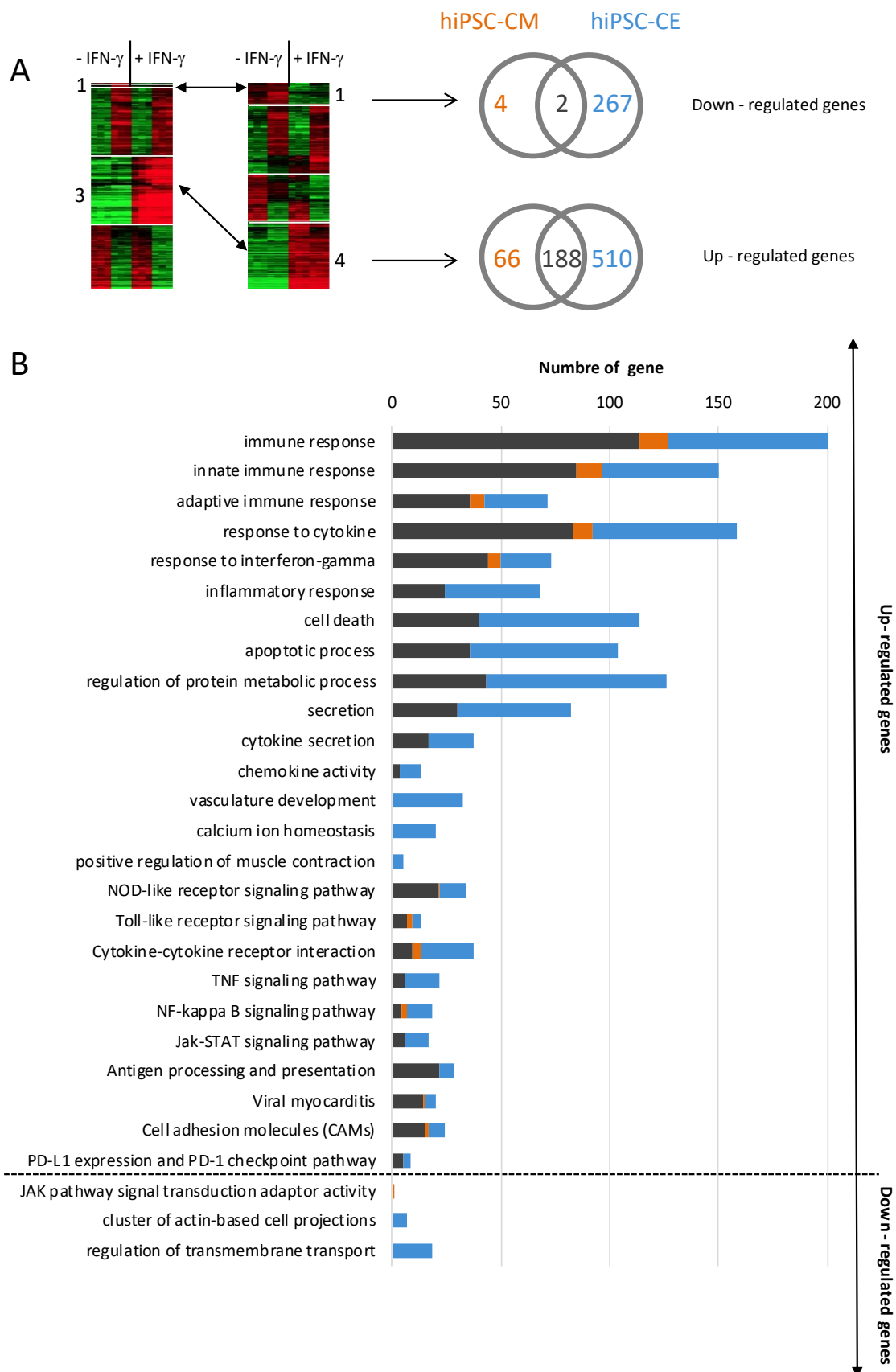
c) Gènes sous-exprimés liés à la cardiotoxicité

Pour identifier les gènes liés à la cardiotoxicité dans chacun des types cellulaires, on a comparé les gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CM du PCC (cluster 4) avec ceux des hiPSC-CE (cluster 3). Sur un total de 775 gènes, 178 sont sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM (70% de gènes dans les hiPSC-CM), 441 sont sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CE (85% de gènes dans les hiPSC-CE), et 78 sont communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE (**Figure 30A**). On ne retrouve pas de processus biologique significatif associé aux 178 gènes sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM du PCC. Par contre, dans les hiPSC-CE, les gènes sont impliqués dans la sécrétion cellulaire et la jonction cellulaire (CXCL12, VWF). Les gènes communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE sous-exprimés chez le PCC sont impliqués dans la fonction ribosomale (ribosomal protein L27A) (**Figure 30A**).

d) Gènes sur-exprimés liés à la cardiotoxicité

Les gènes sur-exprimés dans les hiPSC-CM du PCC (cluster 2) et ceux dans les hiPSC-CE (cluster 2) ont été comparés. Sur un total de 898 gènes, 150 sont sur-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM (55% de gènes dans les hiPSC-CM), 625 sont sur-exprimés spécifiquement dans les CE (84% de gènes dans les hiPSC-CE) et 123 sont communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE (**Figure 30A**). Aucun processus biologique significatif associé aux 150 gènes sur-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CM du PCC, ni pour les 123 gènes communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-CE, n'a été identifié. Par contre, les gènes sur-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-CE provenant du PCC sont associés à plusieurs processus biologiques significatifs en lien avec la réponse immunitaire et inflammatoire notamment *via* la production et la réponse aux cytokines (TLR4, JAK3, IL-1A, IL-1R) mais également l'adhésion cellulaire (tescalcin (TESC), dystrophin (DMD), integrin subunit alpha 4 (ITGA4)), le transport ionique (P2RX7, ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit beta 1 (ATP1B1), la mort cellulaire (CASP3/12) et encore la voie MAPK (MAP3K5, MAP3K8) (**Figure 30, B-C**).

Très peu de voies de signalisation significatives ont été identifiées avec g:profiler, j'ai donc recherché directement ces voies dans la base de données KEGG. Plusieurs voies associées à la réponse inflammatoire et immunitaire ont été retrouvées par KEGG (**Figure 30, B-C**).



C

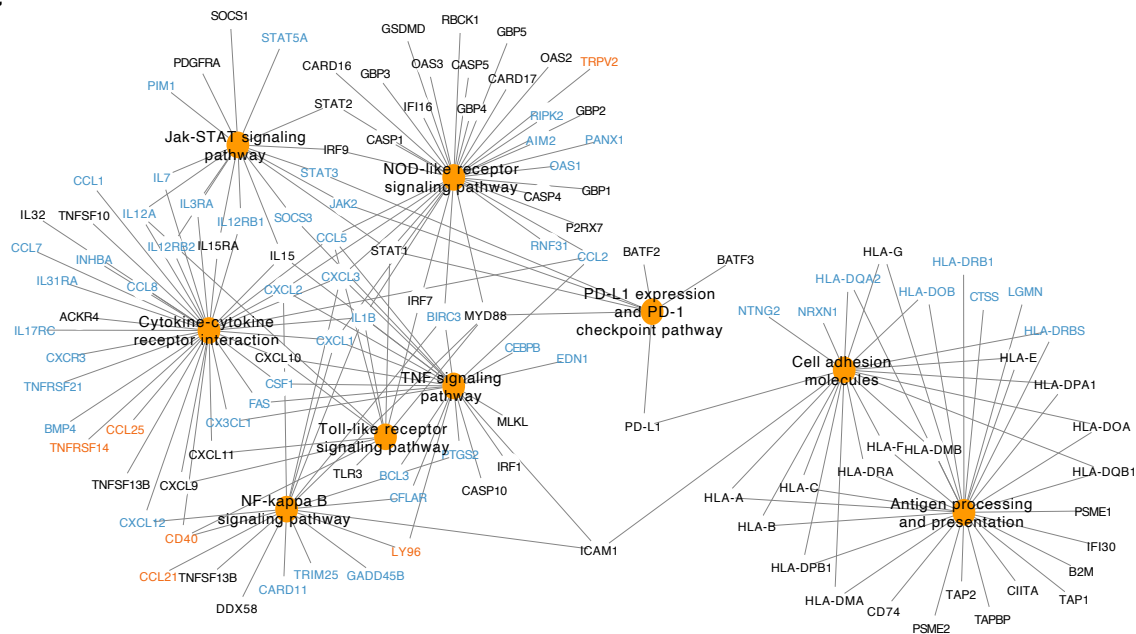


Figure 29 : Processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et des hiPSC-CE associés à la stimulation par l'IFN- γ . (A) Diagrammes de Venn indiquant le nombre de gènes communs et spécifiques des hiPSC-CM et des hiPSC-CE. Gènes différentiellement exprimés (DEGs) obtenus par les analyses SAM multi-classes dans TMeV avec un FDR à 0%. A noter qu'une majorité de gènes sont régulés positivement par l'IFN- γ dans les deux types cellulaires. (B) L'analyse fonctionnelle des DEGs révèle les processus biologiques (termes GO) et les voies de signalisation dans la base de données KEGG. A noter que les hiPSC-CM et hiPSC-CE partagent plusieurs processus biologiques et voies de signalisation, dans lesquels, les hiPSC-CE montrent beaucoup plus de régulations après stimulation à l'IFN- γ . Par ailleurs, le développement et la contraction du muscle vasculaire, l'homéostasie et le transport du calcium sont trouvés uniquement dans les hiPSC-CE stimulés par l'IFN- γ . (C) Réseaux d'interaction des gènes dans les voies de signalisation KEGG dérégulés par l'IFN- γ . Les voies de signalisation KEGG sont en orange, les gènes communs entre hiPSC-CM et hiPSC-CE sont en noir, les gènes spécifiques des hiPSC-CM sont en orange et les gènes spécifiques des hiPSC-CE sont en bleu.

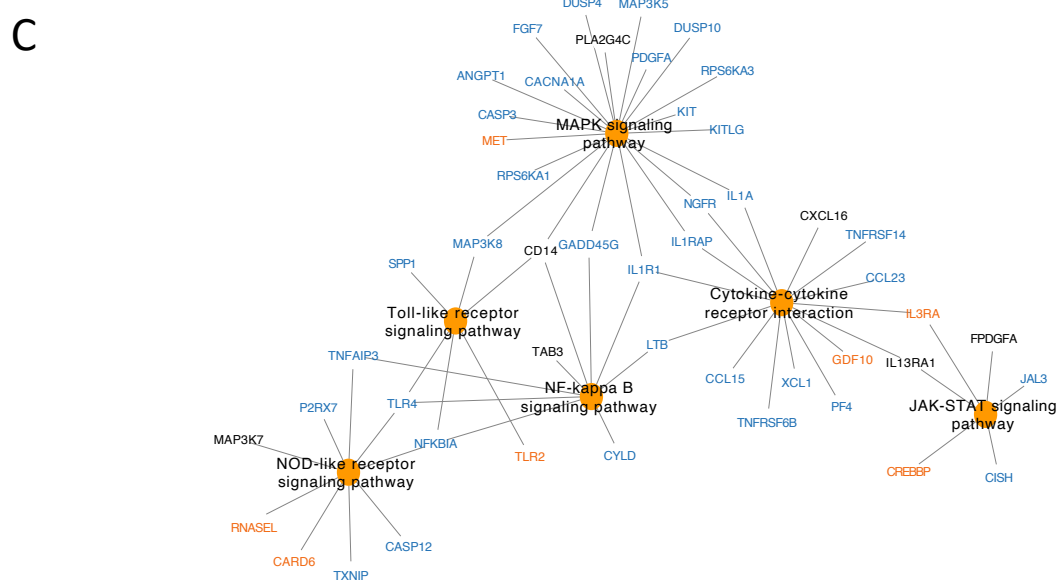
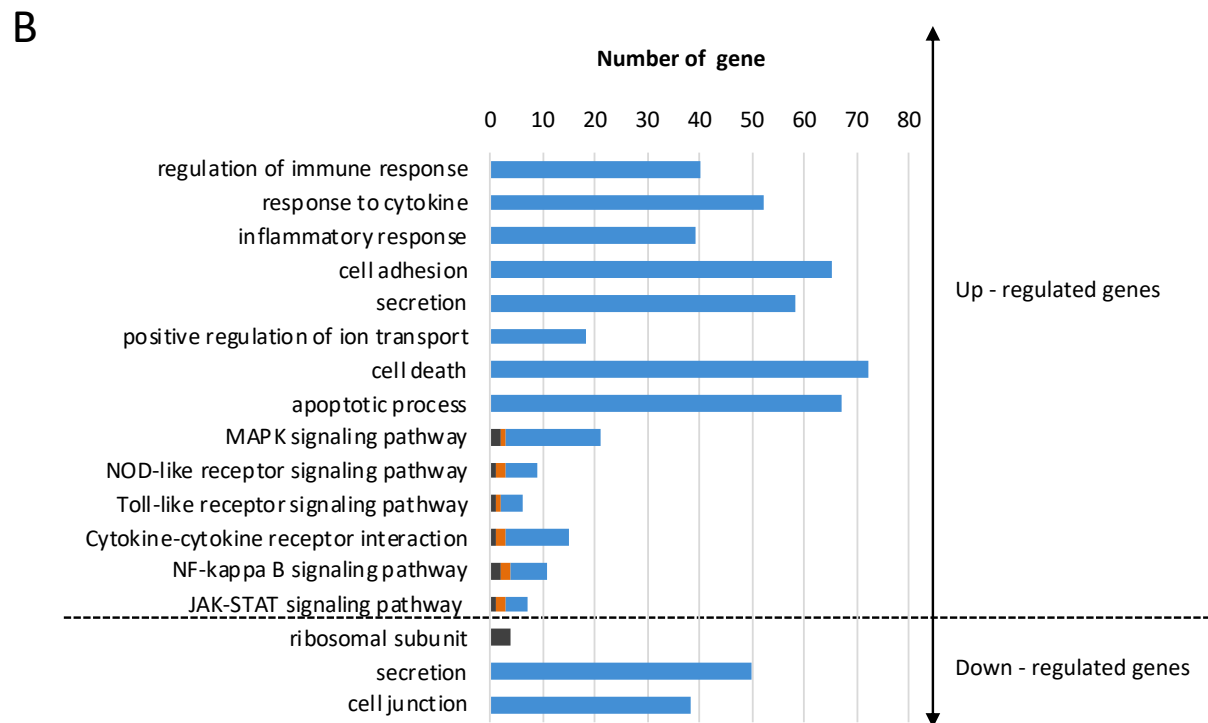
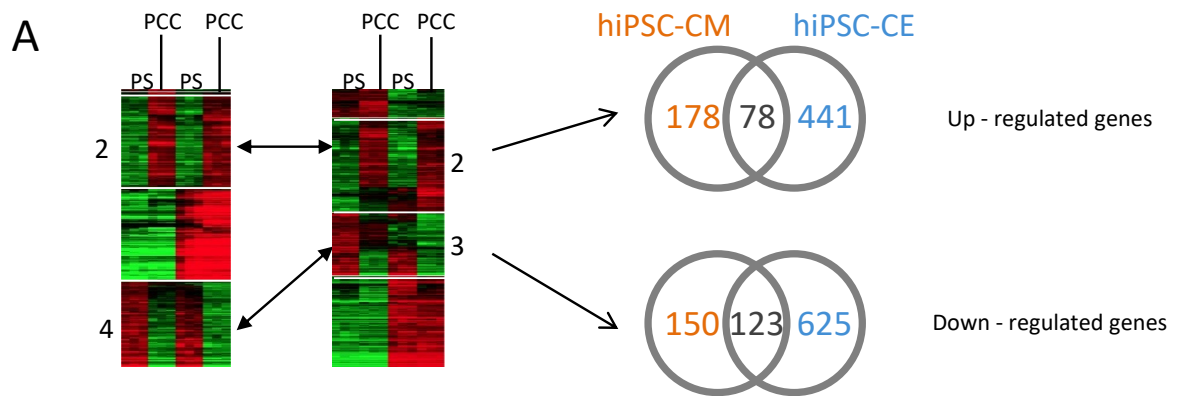


Figure 30 : Processus biologiques et voies de signalisation communs ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-CE associés à la cardiotoxicité. (A) Diagrammes de Venn indiquant le nombre de gènes communs et spécifiques des hiPSC-CM et des hiPSC-CE. Gènes différentiellement exprimés (DEGs) obtenus par les analyses SAM multi-classes dans TMeV avec un FDR à 0%. **(B)** L'analyse fonctionnelle des DEGs relève les processus biologiques (termes GO) et les voies de signalisation dans la base de données KEGG. A noter que les processus biologiques dérégulés par la cardiotoxicité sont trouvés majoritairement dans les hiPSC-CE et sont principalement dans la réponse inflammatoire et immunitaire, la sécrétion et l'apoptose. **(C)** Réseaux d'interaction des gènes dans les voies de signalisation KEGG liés à la cardiotoxicité. Les voies de signalisation KEGG sont en orange, les gènes communs entre hiPSC-CM et hiPSC-CE sont en noir, les gènes spécifiques des hiPSC-CM sont en orange et les gènes spécifiques des hiPSC-CE sont en bleu.

3.2.5. Conclusion de l'étude transcriptomique

Il s'agissait d'une première étude transcriptomique réalisée avec les clones hiPSC dont nous disposions au début de ces travaux. Ce travail, très préliminaire dans l'étude de la réaction cardiotoxique à l'immunothérapie, a été réalisé afin de vérifier le comportement des cellules dérivées des clones et d'identifier quelques voies d'étude possible de cette réaction alors que tout était à faire pour comprendre ce mécanisme car très peu de connaissances existaient sur le sujet.

Nous avons montré dans cette étude :

- qu'une majorité de gènes sont régulés positivement par l'IFN- γ dans les deux types cellulaires, que ce soit dans le PS ou dans le PCC ; ils sont impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, la sécrétion des cytokines, la régulation métabolique, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, et la régulation du transport de calcium. Les voies de signalisation associées sont principalement NOD-like, Toll-like, NF- κ B, JAK/STAT, la présentation d'antigène et la voie PD-1/PD-L1.
- que les hiPSC-CE montrent beaucoup plus de régulations après stimulation à l'IFN- γ que les hiPSC-CM, que ce soit dans le PS ou dans le PCC.
- que dans les hiPSC-CE, en plus d'autres processus biologiques communs aux hiPSC-CM, l'IFN- γ réprime l'expression de gènes liés au cytosquelette et active ceux impliqués dans le développement et la contraction du muscle vasculaire, dans l'homéostasie et le transport du calcium.

- que dans les hiPSC-CE du PCC, les gènes liés à la sécrétion cellulaire et la jonction cellulaire sont régulés négativement, ceux associés à la réponse inflammatoire et immunitaire, l'adhésion cellulaire, l'apoptose, au transport ionique sont sur-exprimés.

Cette analyse semble indiquer qu'au cours de la réaction cardiotoxique, la dysfonction du myocarde pourrait être fortement liée à des régulations endothéliales, soit directement par une dysfonction endothéliale, soit indirectement par une régulation de la cellule endothéliale sur l'activité du cardiomyocyte.

3.3. Étude de la réponse à l'IFN- γ des cellules cardiaques dérivées d'hiPSC provenant de patients porteurs de mélanome, ayant ou non déclaré une myocardite immuno-induite

A partir de l'étude transcriptomique, nous avons sorti une liste des gènes qui sont soit dérégulés par l'IFN- γ , soit liés à la cardiotoxicité, principalement dans les voies de signalisation associées à la réponse inflammatoire et immunitaire des hiPSC-CM et des hiPSC-CE (**Figure 32**) même si le clone dérivé de la personne saine n'était pas le meilleur contrôle pour l'identification des gènes liés à la cardiotoxicité. Dans cette nouvelle étude, nous avons voulu évaluer les effets de l'IFN- γ sur l'expression des gènes (par qPCR) et des protéines (par cytométrie) des hiPSC-CM et des hiPSC-CE provenant de patients porteurs de mélanome, ayant ou non déclaré une myocardite immuno-induite. Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de l'IFN- γ sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM et la prolifération des hiPSC-CE.

Quatre clones hiPSC ont été générés sur la plateforme MaCS à partir de 4 patients porteurs de mélanome traités par ICIs (anti-PD-1/anti-CTLA-4), dont 2 n'avaient pas déclaré de cardiotoxicité (PC) et 2 avaient présenté une cardiotoxicité (PCC) (**Tableau 9**).

Patient porteur de mélanome	Clone hiPSC	Traitement	LVEF (%)	Âge	Sexe	Source d'hiPSC
Non cardiotoxicité	PC1	Anti (CTLA-4 + PD-1)	58	41	M	PBMC
	PC2	Anti (CTLA-4 + PD-1)	52	73	M	PBMC
Cardiotoxicité	PCC1	Anti-PD-1	67	81	F	Fibroblaste
	PCC2	Anti (CTLA-4 + PD-1)	70	70	M	Fibroblaste

Tableau 9 : Caractéristiques des patients recrutés pour la génération de clones hiPSC. LVEF : fraction d'éjection ventriculaire gauche, PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique. M : masculin, F : féminin.

Pour cette étude, des hiPSC-CM et des hiPSC-CE ont été générées et stimulées par 10 ng/ml d'IFN- γ pendant 48h. La durée du traitement a été réduite mais elle induit toujours une condition inflammatoire chronique *in vitro* comme décrit dans la littérature (Cosper et al., 2012 ; Didié et al., 2017 ; Grinnemo et al., 2019).

Pour chaque type cellulaire, quatre groupes d'échantillons (2-3 différenciations indépendantes) ont été comparés : pour les hiPSC-CM : 1) dérivés du clone PC non stimulés et 2) stimulés par l'IFN- γ , 3) dérivés du clone PCC non stimulés et 4) stimulés à l'IFN- γ ; pour les hiPSC-CE : 1) dérivées du clone PC non stimulées et 2) stimulées à l'IFN- γ , 3) issues du PCC non stimulées et 4) stimulées à l'IFN- γ (**Figure 31**). Ces comparaisons nous permettent de rechercher les réponses spécifiques des cellules hiPSC-CM ou hiPSC-CE dérégulés par l'IFN- γ et par la cardiotoxicité.

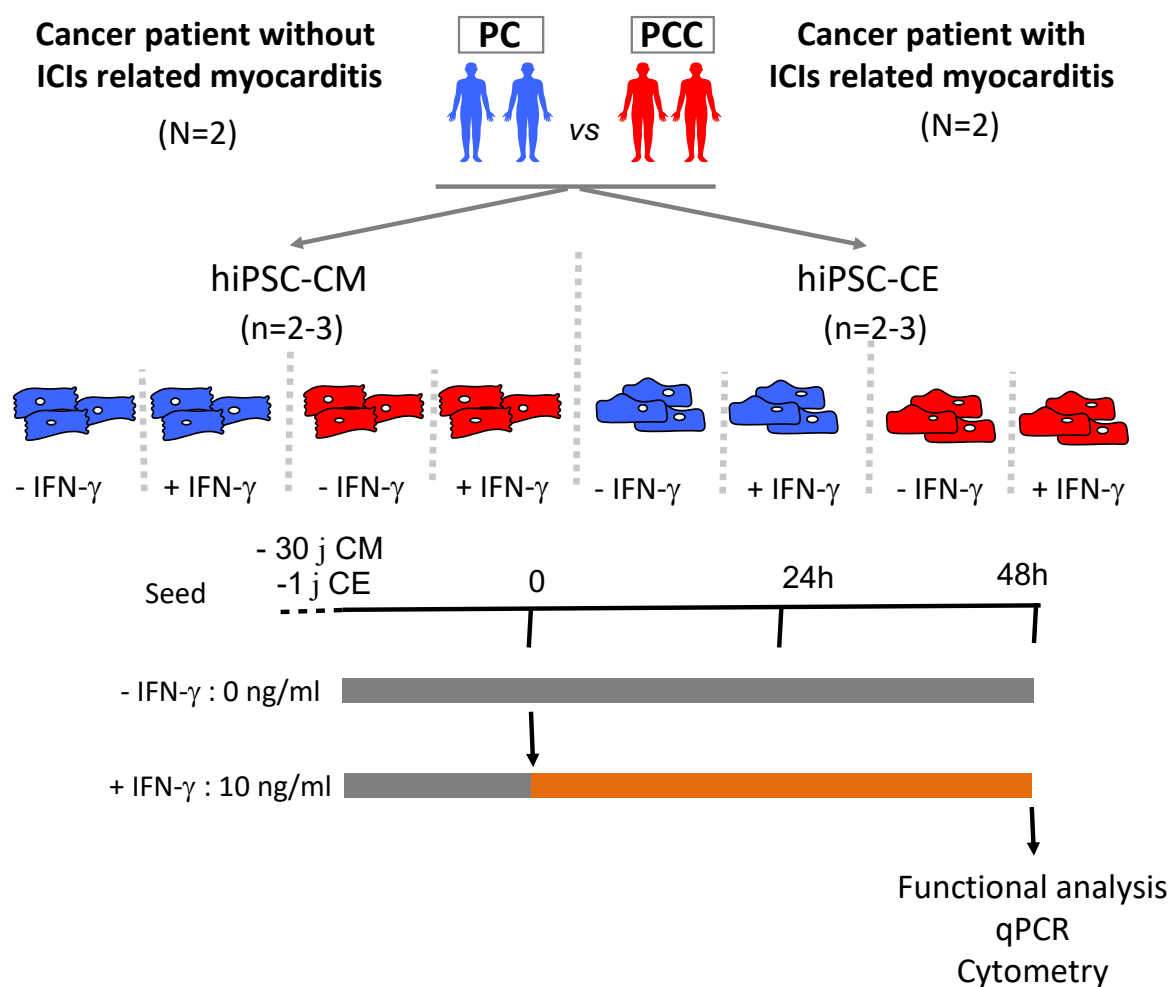


Figure 31 : Plan expérimental ayant servi à générer les échantillons pour identifier les réponses liées à la stimulation à l'IFN- γ et à la cardiotoxicité *via* des analyses moléculaires et fonctionnelles. (A) Les hiPSC-CM et hiPSC-CE ont été générés à partir de 4 patients porteurs de mélanome traités par ICI : 2 n'avaient pas déclaré de cardiotoxicité (PC) et 2 avaient présenté une cardiotoxicité (PCC). N = 2-3 différenciations indépendantes pour chaque clone stimulé ou non à l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. (B) Protocole du traitement des hiPSC différenciées par l'IFN- γ .

3.3.1. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant les médiateurs de l'inflammation

Nous avons retrouvé CXCL9 sur-exprimé par l'IFN- γ à la fois dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE, quel que soit le groupe de patients ($p < 0.0001$ pour toutes les comparaisons). IL-18 n'est pas modifié dans les deux types cellulaires, que ce soit dans le groupe PC ou dans le groupe PCC. Par contre, nous avons trouvé des différences d'expression pour IL-1R et CX3CL1 qui sont sur-exprimés par l'IFN- γ uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PC et du groupe PCC (IL-1R : $p = 0.03$ et $p = 0.002$, CX3CL1 : $p = 0.001$ et $p = 0.0001$; *vs* non stimulées par l'IFN- γ ; chez groupe PC et PCC respectivement). De plus, IL-1B est sur-exprimé uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PCC ($p = 0.04$ *vs* non stimulées par l'IFN- γ). L'expression des gènes IL-1R, CX3CL1 et IL-1B n'est pas modifiée dans les hiPSC-CM par l'IFN- γ (**Figure 32, Tableau 10**).

Nous avons également évalué l'expression des gènes codant des endokines spécifiques dans les hiPSC-CE stimulées par l'IFN- γ par qPCR. L'IFN- γ n'a pas d'effet sur l'expression des transcrits EDN1, THBS1, que ce soit dans le groupe PC ou dans le groupe PCC. Mais, on a trouvé des différences d'expression pour PTGS2, MDK qui sont sur-exprimés uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PCC (PTGS2 : $p = 0.01$, MDK : $p = 0.04$; *vs* non stimulées par l'IFN- γ). Aucune différence est observée pour ces gènes en comparaison entre PCC et PC (**Figure 32, Tableau 10**).

3.3.2. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie JAK/STAT

L'IFN- γ ne modifie pas l'expression du gène pour IFNGR1, IFNGR2 quel que soit les types cellulaires et les groupes des patients. Cependant, il augmente l'expression de STAT1 à la fois dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE ($p < 0.0001$). De plus, nous avons observé que STAT3, JAK1, et JAK2 sont sur-exprimés uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PCC par l'IFN- γ (STAT3 : $p = 0.038$, JAK1 : $p = 0.038$, JAK2 : $p = 0.009$; *vs* non stimulées par l'IFN- γ). Cependant, aucune différence est observée pour ces gènes en comparaison entre PCC et PC (**Figure 32, Tableau 10**).

3.3.3. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie NOD-like et Toll-like

L'IFN- γ augmente l'expression des gènes codant pour NLRC5, GBP5, GBP6, TLR2, et TLR3 dans les deux types cellulaires, à la fois du groupe PC et PCC (hiPSC-CM : NLRC5, GBP5, GBP6, TLR3 : $p < 0.0001$, TLR2 : $p = 0.017$ et $p = 0.038$; hiPSC-CE : NLRC5, GBP5, TLR3 : $p < 0.0001$, GBP6 : $p = 0.0006$ et $p = 0.0001$, TLR2 : $p = 0.0006$ et $p < 0.0001$; *vs* non stimulés par l'IFN- γ). Particulièrement, en comparaison avec le groupe PC, l'expression des gènes GBP6 et TLR3 dans les hiPSC-CM du groupe PCC sont plus élevées au niveau basal (GBP6 : $p = 0.008$, TLR3 : $p = 0.04$) et après le traitement à l'IFN- γ (GBP6 : $p = 0.01$, TLR3 : $p = 0.04$). De plus, nous avons trouvé des différences d'expression pour NLRP3, et TLR4 qui sont sur-exprimés uniquement par l'IFN- γ dans les hiPSC-CE chez les deux groupes PC et PCC (NLRP3 : $p = 0.002$ et $p = 0.004$, TLR4 : $p = 0.04$ et $p = 0.003$; *vs* non stimulées par l'IFN- γ ; chez les groupes PC et PCC, respectivement). Ces gènes ne sont pas modifiés dans les hiPSC-CM par l'IFN- γ (**Figure 32, Tableau 10**).

3.3.4. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant la voie de l'apoptose

Nous avons vu que CASP1, CASP10, et FAS sont sur-exprimés par l'IFN- γ dans les deux types de cellule hiPSC-CM et hiPSC-CE, à la fois du groupe PC et PCC (hiPSC-CM : CASP1 : $p < 0.0001$, CASP10, FAS : $p < 0.05$; hiPSC-CE : CASP1 : $p < 0.0001$, CASP10 : $p < 0.05$, FAS : $p < 0.0005$; *vs* non stimulés par l'IFN- γ) (**Figure 32, Tableau 10**). En plus, au niveau basal, nous avons vu que CASP1 est plus exprimé chez les hiPSC-CE du groupe PCC par rapport celui du groupe PC ($p = 0.002$) (**Figure 32, Tableau 10**). Par ailleurs, dans les hiPSC-CM, l'IFN- γ diminue l'expression de BCL2 uniquement dans les cellules du groupe PCC ($p = 0.04$) ; dans les hiPSC-CE, il est sous-exprimé dans les deux groupes PC et PCC ($p = 0.004$ et $p = 0.0004$, respectivement) (**Figure 32, Tableau 10**).

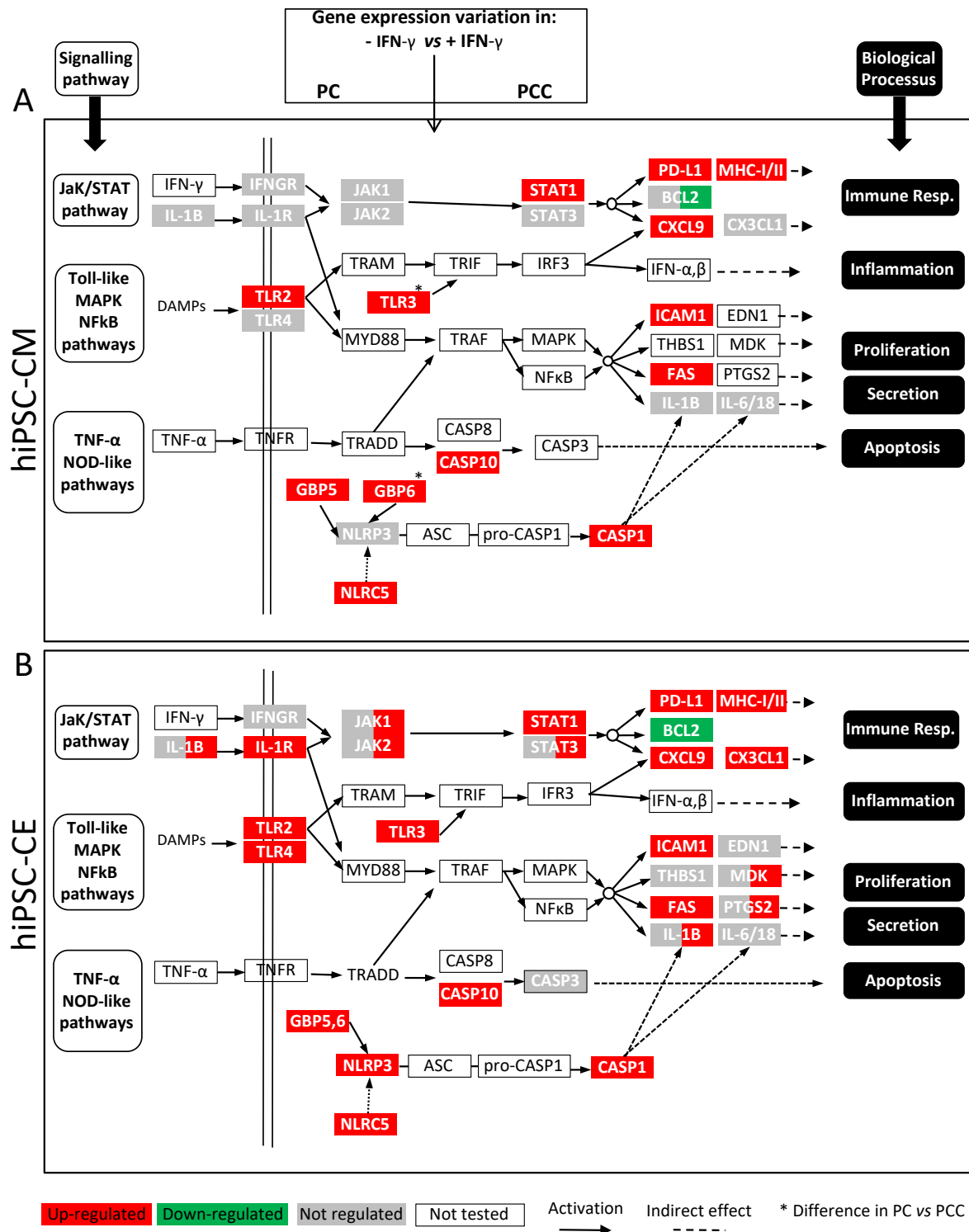


Figure 32 : Synthèse de l'expression des gènes codant les voies de signalisation dans les hiPSC-CM (A) et hiPSC-CE (B), provenant de patients porteurs de mélanomes et ayant ou non présenté une cardiotoxicité, stimulés à l'IFN- γ . Etude réalisée avec 2 clones hiPSC provenant de 2 patients porteurs de mélanome n'ayant pas présenté de cardiotoxicité (PC) et 2 clones hiPSC provenant de 2 patients porteurs de mélanome ayant présenté une cardiotoxicité (PCC). Les hiPSC ont été différenciées en cardiomyocytes (hiPSC-CM) et en cellules endothéliales (hiPSC-CE). N = 2-3 différenciations indépendantes pour chaque clone stimulé ou non à l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. La variation de l'expression du gène par l'IFN- γ dans les cellules du groupe PC est dans la moitié gauche du rectangle, et celle du groupe PCC est dans la moitié droite du rectangle. Le gène est en rouge : sur-exprimé, vert :

sous-exprimé, gris : pas modifié et blanc : pas testé. * différence significative en comparaison du groupe PCC vs PC.

	hiPSC-CM				hiPSC-CE			
	- IFN- γ		+ IFN- γ		- IFN- γ		+ IFN- γ	
	PC	PCC	PC	PCC	PC	PCC	PC	PCC
Cytokines, chemokines and endokines								
IL-1B	13,4 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 0,5	13,5 $\pm$ 1,3	13,7 $\pm$ 1,3	10,8 $\pm$ 1,4	11,0 $\pm$ 1,3	9,9 $\pm$ 1,7	8,9 $\pm$ 1,2*
IL-1R	8,0 $\pm$ 1,3	8,7 $\pm$ 1,2	7,5 $\pm$ 1,1	8,5 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 0,6	7,2 $\pm$ 0,8	6,2 $\pm$ 0,7*	5,4 $\pm$ 0,6**
IL-6	15,1 $\pm$ 0,85	14,5 $\pm$ 1,9	14,8 $\pm$ 1,7	13,7 $\pm$ 1,9	10,9 $\pm$ 0,8	11,7 $\pm$ 1,4	10,6 $\pm$ 0,9	10,6 $\pm$ 0,4
IL-18	11,4 $\pm$ 1,6	10,4 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 1,8	10,7 $\pm$ 0,9	13,8 $\pm$ 0,8	13,6 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 2,3	13,4 $\pm$ 0,6
CX3CL1	8,6 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 0,6	8,1 $\pm$ 0,6	8,9 $\pm$ 1,0	6,6 $\pm$ 2,5	7,8 $\pm$ 2,0	2,5 $\pm$ 2,6**	2,6 $\pm$ 0,7***
CXCL9	18,0 $\pm$ 2,0	17,1 $\pm$ 2,2	6,3 $\pm$ 3,5****	4,3 $\pm$ 0,6****	14,5 $\pm$ 2,8	15,5 $\pm$ 1,5	-1,0 $\pm$ 1,1****	-1,6 $\pm$ 1,0****
PTGS2	ND	ND	ND	ND	8,5 $\pm$ 2,0	10,5 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 1,4	7,8 $\pm$ 0,5*
EDN1	ND	ND	ND	ND	1,4 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 1,7
MDK	ND	ND	ND	ND	3,6 $\pm$ 1,3	4,2 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 1,3	2,3 $\pm$ 0,6*
THBS1	ND	ND	ND	ND	-1,7 $\pm$ 0,2	-1,7 $\pm$ 0,8	-1,8 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,6
NOD/Toll-like signaling								
NLRP3	14,1 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 1,1	13,8 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 0,5	10,8 $\pm$ 1,0	10,6 $\pm$ 0,5	9,0 $\pm$ 0,8**	9,0 $\pm$ 0,2**
NLRC5	10,9 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,7****	2,6 $\pm$ 0,8****	11,3 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,7****	5,0 $\pm$ 0,4****
GBP5	10,7 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 1,3****	5,3 $\pm$ 1,0****	11,2 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 1,6****	0,2 $\pm$ 0,7****
GBP6	13,4 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 1,1§	8,2 $\pm$ 0,7****	6,8 $\pm$ 0,6****§	16,5 $\pm$ 0,4	17,1 $\pm$ 1,3	12,2 $\pm$ 1,1***	11,2 $\pm$ 0,8***
TLR2	13,5 $\pm$ 1,0	12,5 $\pm$ 1,1	11,9 $\pm$ 0,9*	11,1 $\pm$ 0,7*	13,0 $\pm$ 1,0	13,3 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 0,4***	9,8 $\pm$ 0,3****
TLR3	14,3 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 1,8§	8,3 $\pm$ 0,8****	7,1 $\pm$ 0,3****§	13,9 $\pm$ 1,1	14,0 $\pm$ 0,6	8,1 $\pm$ 0,6****	7,6 $\pm$ 1,0****
TLR4	10,0 $\pm$ 1,4	10,1 $\pm$ 1,1	9,2 $\pm$ 1,3	9,4 $\pm$ 1,4	6,9 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,6*	5,5 $\pm$ 0,4**
Apoptosis								
CASP1	14,1 $\pm$ 0,7	13,9 $\pm$ 1,3	7,0 $\pm$ 0,61****	6,7 $\pm$ 0,63****	13,5 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,7§	4,1 $\pm$ 1,05****	3,1 $\pm$ 0,5****
CASP10	11,6 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 0,3*	9,0 $\pm$ 1,0*	4,8 $\pm$ 2,2	3,8 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 1,9*	1,2 $\pm$ 0,4*
CASP3	ND	ND	ND	ND	4,5 $\pm$ 0,4	4,13 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,8
FAS	-0,8 $\pm$ 0,4	-0,8 $\pm$ 0,5	-1,5 $\pm$ 0,3*	-1,5 $\pm$ 0,1*	7,6 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,9***	5,0 $\pm$ 0,4***
BCL2	11,0 $\pm$ 0,3	11,1 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 0,2	12,2 $\pm$ 1,1*	7,0 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2**	8,1 $\pm$ 0,3***
JAK/STAT signaling								
JAK1	7,0 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,8*
JAK2	5,7 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 1,3	5,6 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 1,1	4,1 $\pm$ 1,2	3,3 $\pm$ 1,1**
STAT1	6,3 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 0,5****	2,0 $\pm$ 0,9****	4,8 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 1,4****	0,9 $\pm$ 0,9****
STAT3	5,0 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,5*
IFNGR1	7,6 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,2
IFNGR2	7,0 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,6
Antigen processing and presentation								
PD-L1	10,1 $\pm$ 1,4	10,4 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 0,4**	7,0 $\pm$ 0,3**	7,2 $\pm$ 0,9	7,4 $\pm$ 0,9	4,4 $\pm$ 1,3***	3,8 $\pm$ 0,9****
HLA-B	5,8 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,4****	0,7 $\pm$ 0,8****	1,5 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,4	-2,4 $\pm$ 1,1****	-2,6 $\pm$ 0,4****
HLA-DRA	18,8 $\pm$ 0,4	18,0 $\pm$ 1,0	8,6 $\pm$ 2,0****	9,1 $\pm$ 2,6***	14,0 $\pm$ 2,0	12,2 $\pm$ 2,8	2,3 $\pm$ 3,6****	1,2 $\pm$ 1,9****

Tableau 10 : Variation du niveau d'expression des gènes dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, provenant de patients porteurs de mélanome et ayant ou non présenté une cardiotoxicité, stimulés par l'IFN- γ . Les clones utilisés sont identiques à ceux de la figure 10. Les résultats sont présentés sous forme de $\Delta Ct \pm SD$. Plus la valeur de ΔCt est faible, plus l'expression est élevée. RPL32 a été choisi comme gène de référence. Les études statistiques ANOVA 2 ways, suivi en cas de significativité d'un test Sidak post-hoc, ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9.0, ND : données non disponibles.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus non stimulé

§ $p < 0.05$ PCC versus PC de la même condition, stimulé ou non par l'IFN- γ

3.3.5. Effet de l'IFN- γ sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM

Nous avons ensuite regardé si les hiPSC-CM induits à partir des clones provenant des patients PC et PCC présentaient des différences fonctionnelles. Pour cela, nous avons quantifié les battements et les propriétés contractiles des hiPSC-CM en culture stimulés ou non par l'IFN- γ . L'IFN- γ diminue significativement le nombre de battements dans les hiPSC-CM du groupe PCC (16.0 bpm vs 8.5 bpm, $p = 0.010$) mais pas dans les hiPSC-CM du groupe PC (18.4 bpm vs 14.4 bpm, $p = 0.161$). Cette diminution est plus marquée dans le groupe PCC vs PC après le traitement par l'IFN- γ ($p = 0.036$) (**Figure 33**).

Au niveau basal, les arythmies ont été observées majoritairement dans les CM du groupe PCC par rapport au groupe PC (33.3 % vs 8.9 %), mais nous n'avons pas obtenu une différence significative à cause d'une grande variation entre les différenciations. Cependant, après la stimulation par l'IFN- γ , les arythmies sont plus marquées dans les hiPSC-CM du groupe PCC que du groupe PC (66.7% vs 18.8%, $p = 0.048$) (**Figure 33**).

Par ailleurs, l'IFN- γ augmente la durée de contraction des hiPSC-CM, que ce soit dans le groupe PC ou PCC ($p = 0.029$ et $p = 0.005$) et la durée de relaxation ($p = 0.004$ et $p = 0.001$) (**Figure 33**). L'IFN- γ n'a pas d'effets sur la durée nécessaire pour atteindre le pic et l'amplitude de contraction.

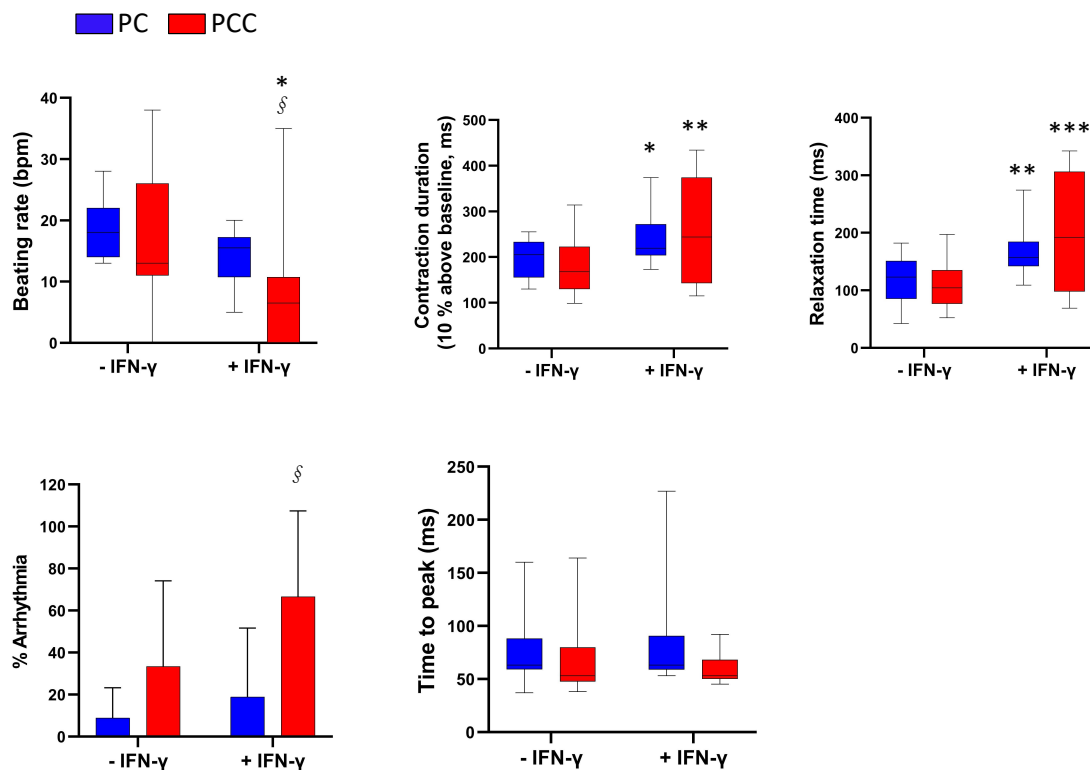


Figure 33 : Effet de l'IFN- γ sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM. Les propriétés contractiles ont été caractérisées à partir de vidéos enregistrées et analysées avec le plugin « MUSCLEMOTION » de l'outil Image J. Les hiPSC-CM dérivés des 2 clones PC (bleu) et des 2 clones PCC (rouge) ont été stimulés par l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. Ces résultats sont issus de 3 différenciations indépendantes.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus non stimulé

§ $p < 0.05$ PCC versus PC stimulé par l'IFN- γ

Nous avons également évalué l'expression des gènes codant des protéines contractiles et des canaux calciques par qPCR. L'expression du gène MYH7 n'a pas été augmentée par l'IFN- γ que dans les hiPSC-CM du groupe PCC ($p < 0.05$) (**Figure 34**). L'expression du gène MYH6 n'a pas été modifiée dans les deux groupes PC et PCC par l'IFN- γ , mais en comparaison avec le groupe PC, MYH6 était plus exprimé dans les hiPSC-CM du groupe PCC avant ($p < 0.0001$) et après le traitement à l'IFN- γ ($p < 0.0001$) (**Figure 34**). Aucune modification de l'expression des transcrits CACNA1C, RYR2, SERCA2/3 n'a été observée dans les hiPSC-CM du groupe PC et PCC après le traitement à l'IFN- γ (**Figure 34**).

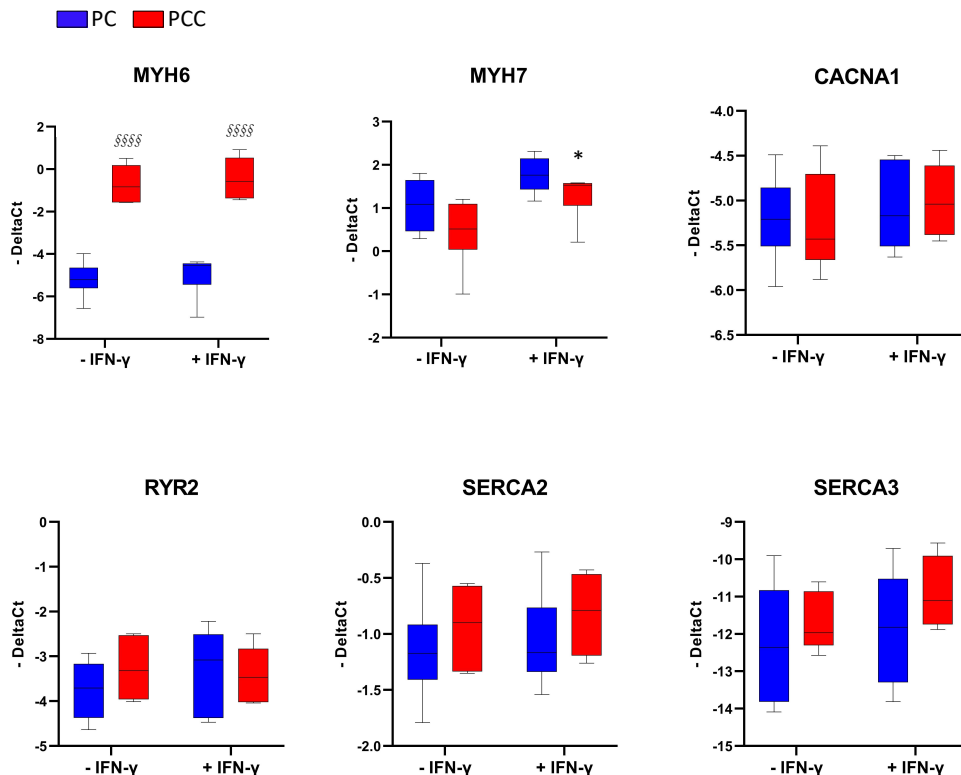


Figure 34 : Effet de l'IFN- γ sur l'expression des gènes codant les protéines contractiles et les canaux calciques dans les hiPSC-CM. Les hiPSC-CM dérivés des 2 clones PC (bleu) et des 2 clones PCC (rouge) ont été stimulées par l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. L'IFN- γ n'augmente que l'expression de MYH7 dans les hiPSC-CM du groupe PCC. En comparant avec le groupe PC, MYH6 dans le groupe PCC est plus exprimé avant et après la stimulation par l'IFN- γ . Ces résultats sont issus de 3 différenciations indépendantes. Les résultats sont présentés sous forme de $\Delta Ct \pm SD$. RPL32 a été choisi comme gène de référence.

* $p < 0.05$ versus non stimulé

§§§§ $p < 0.0001$ PCC versus PC de la même condition, stimulé ou non stimulé par l'IFN- γ

3.3.6. Effet de l'IFN- γ sur la prolifération des hiPSC-CE

L'effet de la stimulation par l'IFN- γ sur la prolifération des hiPSC-CE a été évalué par un dosage de résazurine basé sur la fluorescence. Le résultat montre que l'IFN- γ diminue la prolifération des hiPSC-CE à la fois dans le groupe PC (15.45%, $p < 0.0001$) et le groupe PCC (26.78%, $p < 0.0001$), avec un effet plus important dans le groupe PCC ($p = 0.001$) (**Figure 35**).

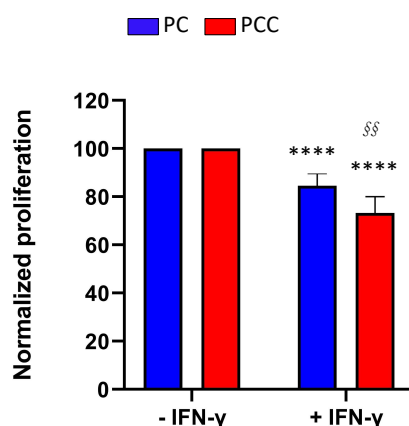


Figure 35 : Effet de l'IFN- γ sur la prolifération des hiPSC-CE. Les hiPSC-CE dérivés des 2 clones PC (bleu) et des 2 clones PCC (rouge) ont été stimulés par l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. Une diminution de la prolifération des hiPSC-CE est plus marquée dans le groupe PCC que dans le groupe PC. Ces résultats sont issus de 2-3 différenciations indépendantes.

**** $p < 0.0001$ versus non stimulé

§§ $p < 0.01$ PCC versus PC stimulé par l'IFN- γ

3.3.7. Effet de l'IFN- γ sur l'expression des marqueurs membranaires impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire des hiPSC-CM et hiPSC-CE

L'expression des gènes HLA-B codant pour le complexe du MHC-I, HLA-DRA codant pour le complexe du MHC-II et PD-L1 est augmentée par l'IFN- γ dans les deux types de cellules que ce soit dans le groupe PC ou dans le groupe PCC (hiPSC-CM : HLA-B et HLA-DR : $p < 0.0001$, PD-L1 : $p = 0.001$ et $p = 0.001$; hiPSC-CE : PD-L1 : $p = 0.0009$ et $p < 0.0001$, HLA-B et HLA-DR : $p < 0.0001$; vs non stimulées par l'IFN- γ ; chez les groupes PC et PCC, respectivement). Il n'y avait pas de différence d'expression des gènes entre les groupes PC et PCC (**Figure 32, Tableau 10**).

De plus, nous avons vérifié l'effet de l'IFN- γ sur l'expression au niveau protéique en mesurant intensité médiane de fluorescence (MFI) par cytométrie.

L'IFN- γ augmente la MFI de PD-L1 et du complexe MHC-I à la fois dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE, que ce soit dans le groupe PC ou PCC (hiPSC-CM : PD-L1 : $p = 0.0005$ et $p < 0.0001$, MHC-I : $p = 0.0002$ et $p < 0.0001$; *vs* non stimulées par l'IFN- γ ; chez les groupes PC et PCC, respectivement). Il est à noter que dans les hiPSC-CE, nous n'avons pas pu faire l'analyse statistique car nous n'avons fait que 2 différenciations indépendantes.

La comparaison des groupes PCC et PC montre que l'expression des protéines PD-L1 et MHC-I est plus élevée dans le groupe PCC des hiPSC-CM après l'IFN- γ (PD-L1 : $p = 0.007$, MHC-I : $p = 0.01$). De plus, nous avons observé que l'expression protéique du complexe MHC-II est très faible avant la stimulation par l'IFN- γ dans les deux types cellulaires et qu'elle est augmentée uniquement dans les hiPSC-CE que ce soit dans le groupe PC ou dans le groupe PCC (Figure 36).

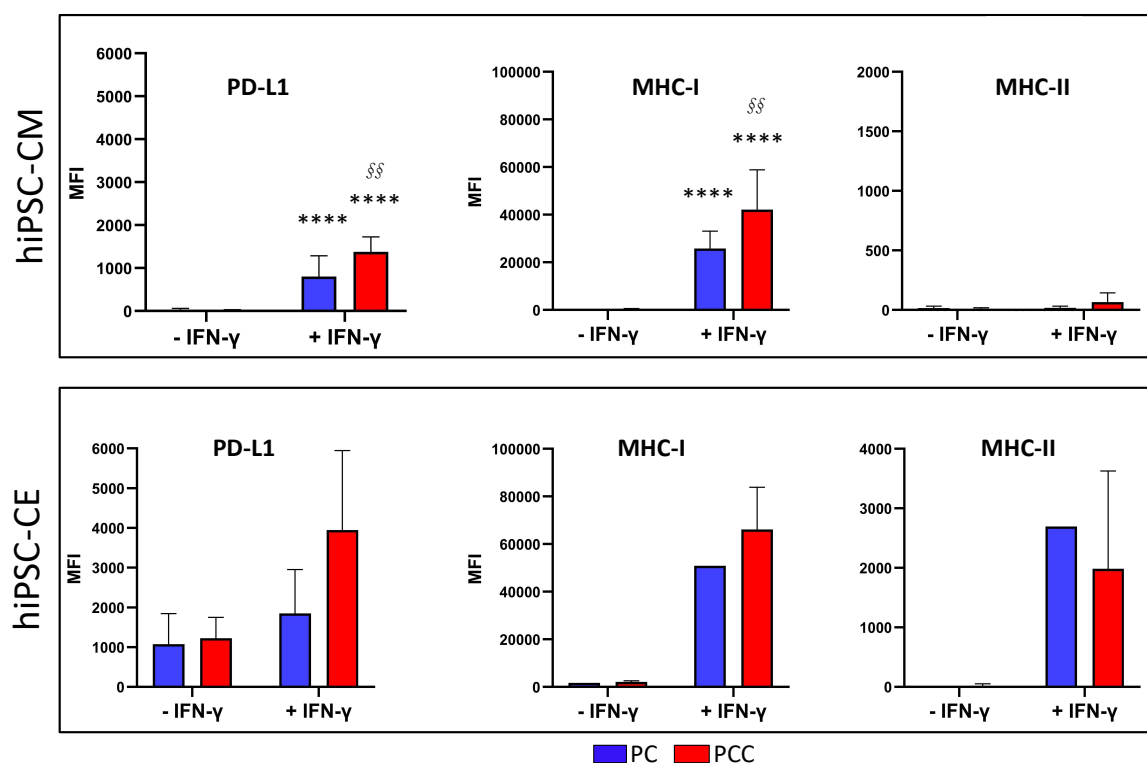


Figure 36 : Effet de l'IFN- γ sur l'expression des marqueurs membranaires impliqués dans l'immunomodulation des hiPSC-CM et hiPSC-CE. Les hiPSC-CM et les hiPSC-CE dérivés des 2 clones PC (bleu) et des 2 clones PCC (rouge) ont été stimulés par l'IFN- γ à 10 ng/ml pendant 48h. L'IFN- γ augmente l'expression de protéine pour PD-L1 et le complexe de MHC-I à la fois dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-CE, que ce soit dans le groupe PC et PCC. L'expression du complexe MHC-II est augmentée uniquement dans les hiPSC-CE par l'IFN- γ . Ces résultats sont issus de 2-3 différenciations indépendantes. Le niveau d'expression des protéines est évalué par intensité médiane de fluorescence (MFI).

**** $p < 0.0001$ *versus* non stimulé

§§ $p < 0.01$ PCC *versus* PC stimulé par l'IFN- γ

3.3.8. Conclusion de l'étude réalisée sur les clones provenant de patients

- L'IFN- γ induit plus de modification sur l'expression des gènes dans les hiPSC-CE que dans les hiPSC-CM en jouant sur plusieurs voies de signalisation liées notamment à l'activation de la réponse inflammatoire et immunitaire et en induisant de l'apoptose.
- Dans les hiPSC-CM, l'IFN- γ induit plus d'arythmies dans les cellules du groupe des patients ayant déclaré une myocardite (PCC) que dans celles du groupe des patients n'ayant pas déclaré de myocardite (PC). L'expression du gène codant pour la protéine MYH6 du sarcomère est plus élevée dans les hiPSC-CM du groupe PCC que celle du groupe PC stimulés ou non par l'IFN- γ . L'IFN- γ augmente l'expression du gène pour MYH7 uniquement dans les hiPSC-CM du groupe PCC. L'augmentation de l'expression des gènes GBP6 et TLR3 est plus marquée dans les hiPSC-CM du groupe PCC que du groupe PC par l'IFN- γ .
- Dans les hiPSC-CE, l'effet de l'IFN- γ sur la diminution de la prolifération semblait également plus présent dans les cellules du groupe PCC que dans celles du groupe PC. Cette observation pourrait être associée à l'activation de la voie de signalisation dans la réponse inflammatoire, notamment par l'augmentation de l'expression des gènes JAK1, JAK2, STAT3, IL-1B, PTGS2 et MDK par l'IFN- γ uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PCC.
- Il semblerait que l'expression de la protéine PD-L1 et du complexe MHC-I dans l'immunomodulation est plus élevée dans les hiPSC-CM du groupe PCC que du groupe PC par l'IFN- γ . L'IFN- γ augmente uniquement l'expression protéique du complexe MHC-II dans les hiPSC-CE.

4. Discussion

4.1. Régulation de la réponse inflammatoire par l'IFN- γ

L'étude transcriptomique réalisée dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, stimulées par l'IFN- γ , était préliminaire mais nécessaire car il n'existait que peu de travaux publiés faisant référence dans ce modèle. L'analyse a montré une sur-expression des gènes, dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, associés à la réponse immunitaire et inflammatoire, à la sécrétion des cytokines, à l'apoptose *via* les voies de signalisation JAK/STAT, TNF- α , NOD-like, Toll-like, NF- κ B et à la présentation des antigènes. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse transcriptomique réalisée sur des cardiomyocytes fœtaux humains où le traitement à l'IFN- γ pendant 7 jours activait la

réponse inflammatoire et immunitaire, la présentation d'antigène, le cycle cellulaire et le voie JAK/STAT1 (Grinnemo et al., 2019).

La voie JAK/STAT est la principale voie activée lors de la transduction du signal après la liaison de l'IFN- γ sur son récepteur. Dans nos modèles, STAT1 était sur-exprimé dans les deux types cellulaires cardiaques mais JAK1, JAK2 et STAT3 étaient sur-exprimés exclusivement dans les hiPSC-CE du groupe PCC. La voie JAK/STAT est impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose (O'Shea et al., 2015). Les cellules endommagées libèrent de l'ADN, de l'ARN double brins et de l'ATP, capables d'activer les récepteurs TLRs. Ceux-ci sont responsables de l'activation d'autres voies inflammatoires comme les voies NF- κ B ou MAPK qui conduisent la production de nombreuses cibles : cytokines, chimiokines ... Dans notre étude, CXCL9 est sur-exprimé à la fois dans les hiPSC-CE et les hiPSC-CM que ce soit dans le groupe PC ou dans le groupe PCC. La production de CXCL9 est induite principalement par l'IFN- γ (Metzemaekers et al., 2018). Il a été démontré que l'augmentation de CXCL9 est corrélée au développement d'une insuffisance cardiaque, d'un dysfonctionnement ventriculaire gauche et au développement d'un remodelage cardiaque défavorable (Altara et al., 2016). Chez un patient porteur de mélanome, ayant déclaré une myocardite après traitement par anti-CTLA-4, CXCL9 était sur-exprimé spécifiquement dans le myocarde ; il n'était pas retrouvé dans le foie ou les poumons eux aussi infiltrés par les cellules T CD8⁺ (Reuben et al., 2017). Chez le singe traité par la combinaison anti-PD-1/anti-CTLA-4, l'augmentation de la concentration d'IFN- γ dans le sérum ainsi que l'expression des gènes STAT1, CXCL9 et son récepteur CXCR3 dans le myocarde étaient observées (Ji et al., 2019).

Nos résultats montrent également la sur-expression par l'IFN- γ de plusieurs gènes des voies Toll-like et NOD-like : TLR2, TLR3, GBP5, GBP6, NLRC5, CASP1 dans les hiPSC-CM et hiPSC-CE, et IL-1B, IL-1R, TLR4, NLRP3 uniquement dans les hiPSC-CE (**Figure 32**). Les TLRs, GBPs, et NLRC5 sont les régulateurs de l'activation de la voie inflammasome (Davis et al., 2011 ; Kim et al., 2016). La voie TLR/NF- κ B activée favorise ensuite la transcription de NLRP3 et de la pro-IL-1 β . L'IL-1 β est une cytokine majeure de la réponse inflammatoire permettant le recrutement de cellules immunitaires innées au site d'infection et la modulation de cellules immunitaires adaptatives (Dinarello, 2009). L'activation de l'inflammasome est nécessaire à la maturation de l'IL-1 β (Bai Baochen et al., 2020). Elle est connue dans la cardiomyopathie auto-inflammatoire, dans la cardiomyopathie ischémique et dans l'athérosclérose (Chen et al., 2018). Récemment, une analyse transcriptomique comparative de

biopsies cardiaques provenant de patients ayant déclaré une myocardite après traitement par ICI, une myocardite virale, ou une cardiomyopathie dilatée a montré que la sur-expression de GBP5 et GBP6 de la voie de l'IFN- γ était liée spécifiquement à la myocardite due aux ICI (Finke et al., 2021). Par ailleurs, l'activation de PD-L1 et de NLRP3 permet aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire (Theivanthiran et al., 2021). Dans notre étude, l'augmentation de l'expression des gènes TLR3 et GBP6 était plus prononcée dans les hiPSC-CM du groupe PCC que du groupe PC (**Figure 32**). Nous avons également trouvé la sur-expression du gène de l'IL-1B et de son récepteur IL-1R uniquement dans le hiPSC-CE du groupe PCC (**Figure 32**). Ces résultats, bien qu'encore très préliminaires, pourraient indiquer que notre modèle d'hiPSC a conservé des mécanismes observés par ailleurs dans le myocarde des patients. Ils montreraient également des processus spécifiques des cellules différenciées soit en cardiomyocytes, soit en cellules endothéliales.

En plus des régulations communes, notre analyse transcriptionnelle a permis de mettre en évidence les régulations spécifiques à chacun des deux types cellulaires suite à la stimulation par l'IFN- γ . Plus spécifiquement, les hiPSC-CE sécrètent de nombreuses molécules, en plus du NO et de l'EDN1, tels que CX3CL1, PTGS2, MDK, THBS1, capables d'influer sur la contraction des cardiomyocytes (Segers et al., 2018). Dans notre étude, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes PTGS2 et MDK uniquement dans les hiPSC-CE du groupe PCC. PTGS2 connue sous le nom de cyclooxygénase (COX2), est un facteur clé pour la progression de l'inflammation. L'administration d'inhibiteurs de COX2 supprimait la myocardite auto-immune chez le rat en modifiant l'équilibre des cytokines des cellules Th1 et Th2 (Suzuki et al., 2006). Par ailleurs, COX2 est une enzyme clé de la biosynthèse des prostaglandines, en particulier la prostacycline (Brutsaert 2003). Le principal effet de la prostacycline sur la contractilité est d'induire un retard de relaxation (Brutsaert 2003). Son rôle dans le remodelage cardiaque est moins bien défini, mais il semblerait que la prostacycline ait des effets anti-hypertrophiques (Ritchie et al., 2004). MDK est un facteur de croissance liant l'héparine qui est connue pour protéger le cœur lors de l'ischémie/reperfusion *via* ses effets anti-apoptotiques (Horiba et al., 2006).

Enfin, nous avons trouvé une diminution de la prolifération des hiPSC-CE dans le groupe PCC qui était plus marquée que celle dans le groupe PC qui pourrait être associée à la dérégulation des gènes codant des cytokines et endokines par l'IFN- γ .

4.2. Effet direct de l'IFN- γ sur la dysfonction cellulaire

L'effet direct de l'IFN- γ sur la dysfonction cellulaire des hiPSC-CM *in vitro* est peu connu. Cosper et al., en 2012, ont montré que le traitement par l'IFN- γ (48h) induisait l'atrophie des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, liée à une dégradation de la myosine. Parallèlement, ils observaient une augmentation du transcrit MYH7 qui était indépendante de la diminution des autres protéines du sarcomère comme troponine, tropomyosine, actine. Récemment, dans un modèle de culture 3D d'hiPSC-CM, stimulé par l'IFN- γ (7 jours), il a été montré que l'IFN- γ induisait une diminution de la force de contraction, une augmentation de la durée de relaxation et une désorganisation du sarcomère. Ces défauts étaient associés à une activation de la voie JAK/STAT conduisant à une augmentation de la sécrétion des cytokines IL-6, IL-7, IL-12p70, IL-18, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) et une diminution de IL-8 et IL-21. De plus, ils ont observé une diminution de l'expression des protéines contractiles comme MYH6, MYH7, MLC2a, MLC2v alors que les transcrits des gènes MYH6 et MYH7 étaient augmentés (Zhan et al., 2021). Dans notre modèle, l'IFN- γ augmente les arythmies des hiPSC-CM, qui sont plus marquées dans le groupe PCC que dans le groupe PC. Nous avons vu également une augmentation de la durée de relaxation et celle du transcrit MYH7 dans les hiPSC-CM du groupe PCC après la stimulation par l'IFN- γ . De plus, nous avons trouvé que MYH6 n'était pas régulé par l'IFN- γ mais qu'il était beaucoup plus exprimé à l'état basal dans les hiPSC-CM du groupe PCC que du groupe PC. Actuellement, aucun auto-anticorps n'a été détecté chez les patients atteints de myocardite lié aux ICI. Dans le développement de la myocardite après un infarctus du myocarde chez les patients, des cellules T productrices d'IFN- γ spécifiques à auto-anticorps anti-MYH6 sont souvent retrouvées (Gottumukkala et al., 2012).

4.3. Effet de IFN- γ sur l'immunomodulation

Les cellules cardiaques sont capables de présenter, comme les cellules APC, des complexes MHC de classe I et II à la membrane qui sont nécessaires à l'activation et la prolifération des cellules immunitaires (Schroder et al., 2004). Nous avons vu que l'IFN- γ augmente plusieurs gènes codant pour les deux complexes MHC de classe I et II dans les deux types de cellules cardiaques. Au niveau protéique, le complexe MHC de classe I était fortement sur-exprimé dans les deux types cellulaires alors que le complexe MHC de classe II n'augmentait que dans les cellules hiPSC-CE suggérant une immunomodulation différente entre des hiPSC-CM et hiPSC-CE. Notre observation est similaire à ce qui est observé dans les cardiomyocytes dérivés des cellules souches parthénogénétiques pluripotentes induites par l'activation pharmacologique

des ovocytes non fécondés (Didié et al., 2017). Les cardiomyocytes adultes n'expriment pas de MHC de classe II, même après stimulation par l'IFN- γ (Hufnagel and Maisch, 1991). Cette propriété pourrait être la signature de la maturation immunologique des hiPSC-CM mais également pourrait être nécessité d'une stimulation prolongée jusqu'à 7 jours (Grinnemo et al., 2019).

Un autre mécanisme important lié à l'inactivation des cellules T, suite à la stimulation pro-inflammatoire par l'IFN- γ , est la voie PD-1/PD-L1. PD-1, exprimé à la membrane des cellules T, se lie à PD-L1 sur-exprimé par l'IFN- γ à la membrane des cardiomyocytes et des cellules endothéliales induisant l'inactivation ou l'apoptose des cellules T (Tajiri and Ieda, 2019). L'augmentation de l'expression de PD-L1 a également été retrouvée dans le myocarde des patients ayant présenté une myocardite après traitement par ICI (Johnson et al., 2016). Dans un modèle de myocardite induite par l'injection des cellules T CD8⁺, PD-L1 induite par l'IFN- γ dans l'endothélium cardiaque joue un rôle majeur dans la prévention de la myocardite létale (Grabie et al., 2007). Nous avons observé une augmentation de PD-L1, transcrit et protéine, dans les hiPSC-CM et CE. En comparaison du groupe PCC avec PC, il semblait que l'augmentation de l'expression protéique de PD-L1 dans les hiPSC-CM soit plus marquée dans le groupe PCC par l'IFN- γ ce qui suggère réponse immunitaire différente des hiPSC-CM du groupe PCC par rapport à ceux du groupe PC.

5. Limites et perspectives

La limitation principale de nos travaux est le nombre de clones testés pour chacun des groupes. En effet, nous n'avons à ce jour que 2 patients et 4 clones (2 clones par patient) par groupe et ces résultats préliminaires doivent être complétés pour atteindre 3 à 5 patients par groupe. Néanmoins, les résultats obtenus nous confortent dans l'idée que notre modèle nous permettra de caractériser certains mécanismes liés à la cardiotoxicité des ICIs.

Par ailleurs, nos résultats sont pour le moment limités à la régulation des transcrits, et nous devons les compléter par des études sur l'expression protéique particulièrement celle des acteurs de la voie inflammasome (CASP1, NLRP3, IL-1B, TLR3, GBP6), de la voie JAK/STAT (STAT1/3, JAK1/2), ainsi que les protéines contractiles (MYH6, MYH7). Il manque également des tests fonctionnels, que ce soit sur les hiPSC-CM ou les hiPSC-CE, afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués.

Actuellement, il existe très peu de travaux décrivant le rôle des cellules endothéliales dans la régulation de la contractilité des cardiomyocytes, et aucun décrivant ce rôle dans les toxicités liées aux ICIs. Nous avons commencé à mettre ces deux types cellulaires en co-culture et nous allons poursuivre le développement de ce modèle afin de mieux comprendre l'importance des effets paracrines dans la toxicité aux ICIs. Pour cela, nous envisageons d'ajouter des lymphocytes T et des ICIs dans ce modèle de co-culture hiPSC-CM et hiPSC-CE et d'étudier les interactions entre toutes ces cellules dans chacun des groupes de patients.

Enfin, une des limites du modèle hiPSC-CM est l'obtention de cellules qui restent malgré tout immatures, même après 45-60 jours de culture. Nous allons tenter de les électro-stimuler grâce au système Multi Electrode Array (MEA). Cette stimulation a déjà été réalisée dans ce type de cellules et a montré de bons résultats.

6. Conclusion

Dans ce projet, j'ai mis au point un modèle de culture de cellules souches pluripotentes induites, différenciées en cardiomyocytes et cellules endothéliales pour étudier la réponse de cellules humaines à la stimulation par l'INF- γ . Ce modèle nous a permis de montrer que l'INF- γ induisait une réponse immunitaire commune et spécifique des hiPSC-CM et hiPSC-CE en jouant sur plusieurs voies de signalisation de l'inflammation. Dans cette réponse, des gènes candidats comme TLR3, GBP6 dans les hiPSC-CM ; JAK1, JAK2, STAT3, IL-1B, PTGS2, MDK dans les hiPSC-CE sont être des cibles pour lesquels nous souhaitons vérifier l'implication dans la myocardite immuno-induite.

Ces résultats sont préliminaires mais très encourageants car nous retrouvons des molécules observées par ailleurs dans le modèle de myocardite immuno-induite ou dans les biopsies de patients avec myocardite ICI dépendante.

Discussion générale

Le système immunitaire joue un rôle central dans la réponse de l'hôte contre les agressions infectieuses et non infectieuses. Lors de réponses inflammatoires aiguës, les événements moléculaires et les interactions cellulaires minimisent efficacement les blessures ou les infections et contribuent à la restauration de l'homéostasie tissulaire. Cependant, la réponse immunitaire peut être inappropriée et causer des dysfonctions organiques, y compris au niveau cardiaque (Mann, 2015) (**Figure 37**).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé sur deux pathologies cardiaques dans lesquelles la réponse immunitaire et inflammatoire excessive participe à la dysfonction du myocarde. Ainsi, cette dysfonction observée chez 60% des patients en choc septique (Vieillard-Baron et al., 2008) et létale dans plus de 40% des cas par une réponse inflammatoire excessive et systémique (Singer et al., 2016). Dans le cadre des cardiotoxicités liées à l'immunothérapie anti-cancéreuse, moins de 2% des patients présentent une myocardite immuno-induite mais celle-ci est létale dans presque 50% des cas (Mahmood et al., 2018).

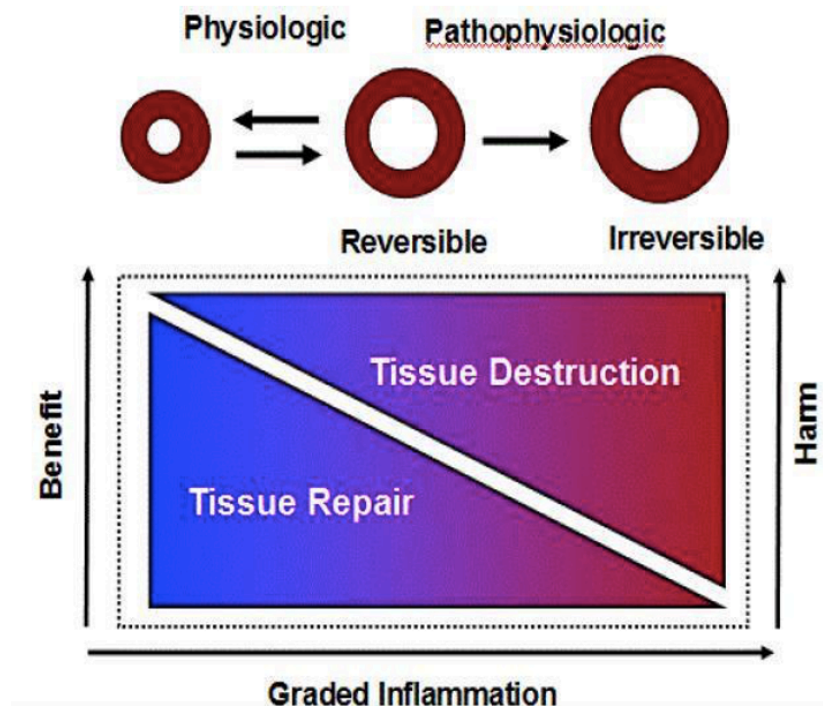


Figure 37 : Para-inflammation. Le principal rôle de la réponse inflammatoire dans le cœur est de réparer les lésions afin de restaurer l'homéostasie tissulaire. Une réponse inflammatoire excessive et prolongée peut être néfaste et contribuer au développement d'une dysfonction cardiaque. D'après Mann, 2015.

1. Participation de la réponse immunitaire à la dysfonction cardiaque

L'implication du système immunitaire dans la dysfonction cardiaque est complexe et encore très mal comprise. La réponse inflammatoire est l'activation coordonnée de diverses voies de signalisation, qui régulent l'expression de plusieurs médiateurs pro- et anti-inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les leucocytes recrutés dans le sang (Lawrence, 2009). Cette réponse inflammatoire partage des processus communs dans différents types de pathologies cardiaques (**Figure 38**). En particulier, les TLRs sont indispensables à la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs, agissant sur la voie de signalisation en aval comme la voie NF- κ B afin de favoriser la production de cytokines et de chimiokines. Les TLRs, interagissant avec les voies de signalisation NF- κ B et JAK/STAT, participent à la dysfonction cardiaque dans le sepsis (Baumgarten et al., 2006 ; Zou et al., 2010). On connaît également le rôle des NLRs, dans la dysfonction cardiaque septique, associés au complexe inflammasome tel que NLRP3 (Busch et al., 2016). L'activation de la signalisation TLRs, NLRP3 et JAK/STAT a également été observée chez le singe dans la myocardite induite par l'injection combinée d'anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (Ji et al., 2019).

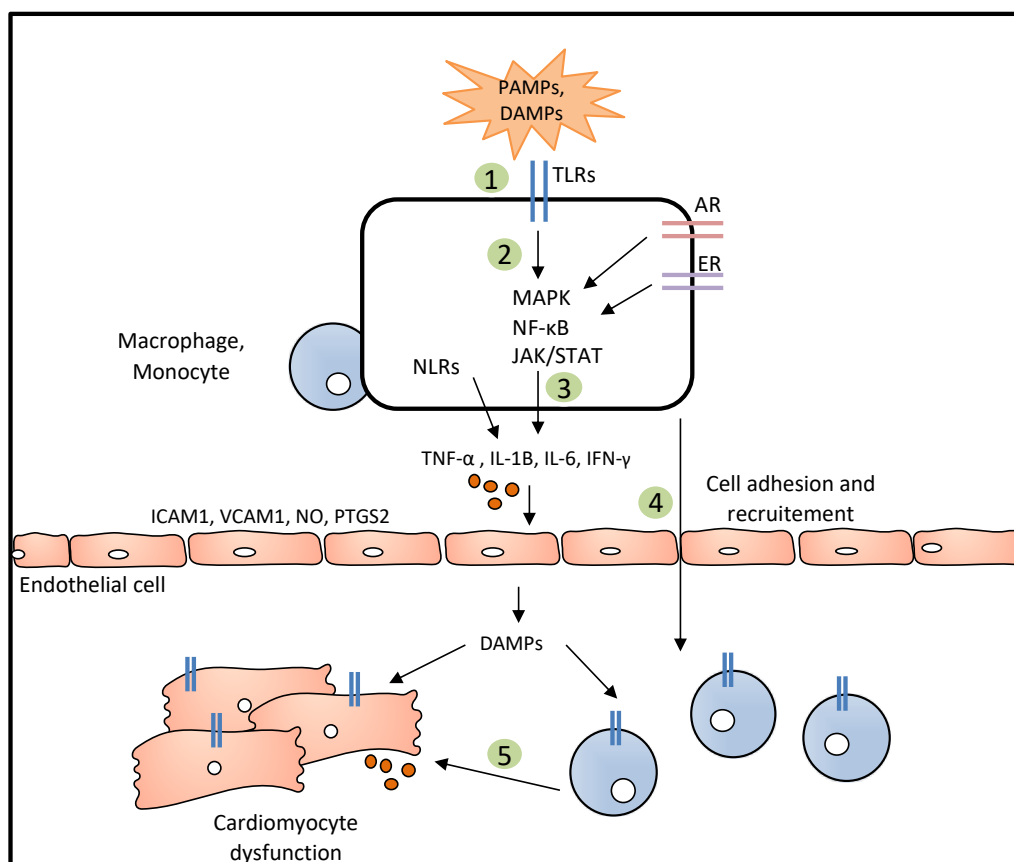


Figure 38 : La réponse immunitaire liée à la dysfonction cardiaque. Le système immunitaire est activé par la détection des PAMPs et DAMPs, grâce aux récepteurs TLRs ou NLRs **(1)** afin d'activer des voies de signalisation inflammatoire **(2)**, permettant la libération des nombreux médiateurs inflammatoires **(3)**, qui favorisent ensuite le recrutement des cellules inflammatoires dans le tissu cardiaque **(4)** et provoquent la dysfonction des cardiomyocytes **(5)**. Le système nerveux autonome et les hormones sexuelles participent à la modulation de la réponse immunitaire. AR : récepteur adrénergique, ER : récepteur aux œstrogènes.

Dans mes travaux de thèse, j'ai retrouvé ces processus communs à la fois dans le modèle murin de cardiopathie septique, et dans le modèle cellulaire d'hiPSC, différenciées et stimulées par l'INF- γ , mis en place dans le cadre des toxicités immuno-induites.

Au delà de ces processus communs, le système immunitaire est activé de manière spécifique dans la phase initiale des pathologies cardiaques et ceci en fonction de l'origine de la stimulation, de la localisation de l'inflammation, du sexe, de l'état hormonal, du type cellulaire concerné... (Frantz et al., 2018). Effectivement, l'activation du système immunitaire est complètement différente si on compare la cardiomyopathie septique avec la myocardite immuno-induite. Dans un cas, le système immunitaire inné est déclenché de manière excessive dans un premiers temps afin de défendre le tissu contre l'infection, dans l'autre cas, le système immunitaire adaptatif est déclenché suite à l'activation excessive des cellules T à cause d'une inhibition de la voie PD-1/PD-L1 par exemple. Ainsi, une analyse transcriptomique comparative de biopsies cardiaques a révélé 3 784 gènes différentiellement sur-exprimés entre des patients cancéreux atteints d'une myocardite immuno-induite, des patients atteints d'une myocardite virale dont on peut avoir les étiologies comparatives, et des patients atteints d'une dilatation cardiaque présentant tous une réduction de la fraction d'éjection (Finke et al., 2021).

Le sexe masculin est un facteur de risque dans le développement de l'insuffisance cardiaque de la plupart des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, la cardiomyopathie dilatée, la myocardite (Fairweather et al., 2013), et la cardiomyopathie septique (Sato et al., 2016). Le mécanisme reste incertain mais une différence dans la fonction immunitaire selon le sexe joue certainement un rôle important (Angele et al., 2014). Plusieurs études ont montré que le sexe influence le pronostic et la survie dans le sepsis et le choc septique par l'intermédiaire d'une modulation des réponses immunitaires. Cette modulation semble être liée à l'action des hormones sexuelles, avec un effet protecteur des hormones sexuelles féminines sur la fonction myocardique. Nous avons montré que la dysfonction cardiaque est plus prononcée chez les femelles OVR que chez les femelles contrôles, et qu'elle est liée à un état inflammatoire plus prononcé. L'effet protecteur des hormones sexuelles femelles est encore

appuyé par notre étude où la dysfonction cardiaque est moindre chez les femmes que chez les mâles, et qu'elle est liée à un profil inflammatoire moindre. Concernant la myocardite immuno-induite, bien que plusieurs études ont rapporté un taux de 66.7% des cas de myocardite signalés chez les hommes, cela peut refléter une représentation disproportionnée des hommes traités par les ICIs et, plus généralement, dans le recrutement des essais cliniques (Hu et al., 2019). D'autres auteurs ont démontré une incidence de myocardite associée aux ICIs plus élevée chez les femmes que chez les hommes, après analyse des bases de données disponibles (Zamami et al., 2019). Si ce résultat se confirme, il signifierait que la myocardite immuno-induite serait différente des autres formes de myocardite pour lesquelles l'incidence est plus élevée chez les hommes (Waliany et al., 2021).

Le myocarde est composé de différents types de cellules, notamment des cardiomyocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules souches et des cellules immunitaires (Pinto et al., 2016). Cette pluricellularité permet, au sein de l'organe, une communication intercellulaire qui est indispensable lors du développement cardiaque, mais qui joue également un rôle modulateur important dans le cœur sain et dans le cœur défaillant chez l'adulte. Actuellement, on ne connaît pas les mécanismes cellulaires liés à la dysfonction cardiaque immuno-induite. Dans notre modèle d'hiPSC différenciées, nous avons observé que les cellules endothéliales répondaient à l'IFN- γ par une dérégulation d'un très grand nombre de gènes comparé aux cardiomyocytes. Il est donc primordial de poursuivre le développement de notre modèle de cardiotoxicité *in vitro*, dans lequel la co-culture des hiPSC-CM, des hiPSC-CE et des lymphocytes T, stimulés par les ICIs, pourrait permettre d'identifier le rôle de chacun des types cellulaires ainsi que leurs interactions par une analyse de séquençage en cellule unique. Ce travail, associé à l'étude de biopsies myocardiques dans le cadre d'une approche translationnelle mise en place dans l'équipe, permettrait de mieux comprendre la réaction cardiotoxique induite par l'immunothérapie.

2. Application dans le criblage de marqueurs prédictifs et l'identification des cibles thérapeutiques

Les analyses transcriptomiques permettent potentiellement d'identifier des molécules uniques, pouvant servir à diagnostiquer les patients à risque, surtout à des stades précoces dans le cadre de la prévention. En plus de fournir des informations sur le pronostic des patients présentant une dysfonction cardiaque, la quantification des biomarqueurs inflammatoires permettrait d'identifier des sous-ensembles de patients qui seraient les plus susceptibles de bénéficier de

stratégies anti-inflammatoires. Par exemple, il n'existe pas aujourd'hui de marqueur spécifique pour la myocardite immuno-induite, le diagnostic est encore difficile et demande de l'imagerie cardiaque extensive et une biopsie cardiaque à risque pour le patient. Une seule étude publiée à ce jour démontre le rôle des régulateurs de l'inflammasome, répondant à l'IFN- γ dont GBP5 et GBP6, dans la myocardite induite par les ICI (Finke et al., 2021). Mon travail de thèse a permis d'établir un modèle cellulaire, généré à partir des cellules de patients ayant déclaré une myocardite immuno-induite, dans lequel des résultats préliminaires ont été obtenus sur la réponse à la stimulation par l'IFN- γ . Impliqués dans cette réponse, j'ai retrouvé GBP6 et TLR3 dans les cardiomyocytes et IL-1B dans les cellules endothéliales.

Parmi les cibles identifiées, le tofacitinib, un inhibiteur de JAK qui bloque la production de cytokines pro-inflammatoires par la suppression de la voie JAK/STAT et déjà approuvé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, pourrait être un bon candidat dans le traitement du sepsis (Clere-Jehl et al., 2020). En effet, une méta-analyse à partir de 29 études sur 13 611 patients atteints de maladies inflammatoires à médiation immunitaire, l'utilisation du tofacitinib a montré des effets positifs sur l'inflammation sans augmentation des complications cardiovasculaires ni de la mortalité (Xie et al., 2019). Le tofacitinib a également montré des bénéfices chez les patients atteints de myocardite associée aux ICI, résistante aux corticostéroïdes (Wang et al., 2021). Il est intéressant de noter que la voie de signalisation JAK/STAT joue un rôle majeur dans la tumorigenèse de divers cancers et peut favoriser l'évasion tumorale en conférant une expression élevée de PD-L1 aux cellules tumorales (Hu et al., 2019). Par conséquent, le ciblage de la voie JAK/STAT pourrait également avoir un effet anti-tumoral synergique au cours de l'immunothérapie.

Récemment, une étude sur plus de 10 000 patients atteints de thrombose avec infarctus du myocarde antérieur et élévation de la protéine C réactive, a montré que le traitement par canakinumab, anticorps anti-IL-1 β , réduisait les complications cardiovasculaires ainsi que la mortalité (Everett et al., 2019). D'autres thérapies ciblées de TLR2, TLR4, PPAR-alpha, NLRP3, ... pourraient également être bénéfiques mais restent encore à caractériser (Frantz et al., 2018). Par ailleurs, une réduction de la réponse inflammatoire en utilisant des β -bloquants pour la prévention et le traitement de la dysfonction myocardique liée au sepsis est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse. La stratégie de traitement par immunosuppresseur est fortement à considérer dans le cadre des myocardites immuno-induites en cas d'évolution défavorable du traitement des corticoïdes, particulièrement chez les patients ayant développé une myocardite très tôt après le traitement par ICI, ainsi que lors d'instabilité

hémodynamique/électrique ou d'événements indésirables neuromusculaires. De plus, les auteurs ont montré que le traitement de l'infliximab (inhibiteur de TNF- α) est associé à une augmentation du risque de décès cardiovasculaire ce qui suggère qu'une précaution doit être prise avec cette molécule (Cautela et al., 2020).

Conclusion

En conclusion, le système immunitaire joue un rôle important mais complexe dans le développement et la régulation des dysfonctions cardiaques de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Si les stratégies d'immuno-modulation semblent très prometteuses, elles présentent d'importantes difficultés. Premièrement, la majorité des tentatives d'identification des voies de signalisation sont recherchées dans des modèles animaux qui ne sont pas tous régulés de manière identique à l'homme. Deuxièmement, chacune de ces voies de signalisation va impacter de nombreuses activités biologiques et pas uniquement la réponse immunitaire. Troisièmement, les voies connexes s'influencent mutuellement au travers d'un réseau complexe d'interactions. Il est donc primordial d'approfondir nos connaissances sur le rôle du système immunitaire et de l'inflammation dans les maladies cardiovasculaires. Identifier les voies de signalisation, mieux comprendre leur rôle, et rechercher des cibles à visée thérapeutique est un long chemin encore à parcourir mais qui s'avère être une voie stratégique majeure, à prendre en considération à l'avenir dans le traitement des cardiopathies.

Perspectives

La médecine de précision est une nouvelle approche très prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge des patients. Une compréhension globale des caractéristiques moléculaires causales de la maladie permettrait d'identifier des marqueurs pronostiques et de sélectionner le traitement ciblé le plus adapté pour chaque patient.

Cette approche innovante est en passe de devenir une réalité grâce aux forts progrès des technologies dites « omiques » telles que la génomique, la protéomique, la métabolomique et la bioinformatique afin de créer une cartographie humaine numérique. De plus, le modèle de cellules souches pluripotentes induites, reprogrammées à partir d'échantillons biologiques provenant directement des patients, apparaît comme un nouveau modèle très puissant. En effet, cette approche permet non seulement d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes physiopathologiques, mais sert aussi de modèle pour le criblage des médicaments à haut débit et la validation fonctionnelle des différentes études pharmacogénomiques. Par exemple, après

qu'un patient ait reçu un diagnostic de cancer, des hiPSC-CM peuvent être générés pour cribler les thérapies potentielles. Les hiPSC-CM peuvent être évalués par un certain nombre de paramètres fonctionnels et transcriptionnels pour prouver l'efficacité du traitement ainsi que sa toxicité. A partir de ces analyses, les médicaments plus sûrs peuvent être sélectionnés pour le patient, minimisant ainsi le risque de cardiotoxicité.

Notre équipe s'inscrit parfaitement dans cette optique grâce à la mise en place de la modélisation *in vitro* de la réaction cardiotoxique induite par l'immunothérapie, ainsi que l'analyse de prélèvements sanguins et de biopsies myocardiques.

Notre intérêt pour la médecine de précision s'applique également à l'étude du choc septique. Face aux difficultés liées à cette pathologie multifactorielle, le développement de biomarqueurs fiables améliorera considérablement notre compréhension de l'évolution du sepsis. Nous rechercherons des marqueurs pronostiques du choc septique à partir des modifications épigénétiques chez les patients en sepsis. Sachant que nous avons déjà démontré la présence d'un dimorphisme sexuel dans la réponse immunitaire associée à la cardiomyopathie septique, nous devrons respecter ce critère afin d'avoir une réponse spécifique de chaque sexe.

Bibliographie

Abi-Gerges, N., Tavernier, B., Mebazaa, A., Faivre, V., Paqueron, X., Payen, D., Fischmeister, R., Méry, P.F., 1999. Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1196–1204. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.4.9808149>

Aboab, J., Seville, V., Jourdain, M., Mangalaboyi, J., Gharbi, M., Mansart, A., Annane, D., 2011. Effects of esmolol on systemic and pulmonary hemodynamics and on oxygenation in pigs with hypodynamic endotoxin shock. *Intensive Care Med* 37, 1344–1351. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2236-y>

Ackland, G.L., Yao, S.T., Rudiger, A., Dyson, A., Stidwill, R., Poputnikov, D., Singer, M., Gourine, A.V., 2010. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 38, 388–394. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c03dfa>

Alarcón, M.M.L., Ruocco, J.F., Ferreira, F., Paula-Neto, H.A., Sepúlveda, M., Vila Petroff, M., Carvalho, A.B., Ramos, I.P., Branda, H.J., Paiva, C.N., Medei, E., 2018. Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 Caspase 1- Interleukin-1 β -Axis are Not Involved in Colon Ascendens Stent Peritonitis-Associated Heart Disease. *Shock* 50, 483–492. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001059>

Altara, R., Manca, M., Hessel, M.H., Gu, Y., van Vark, L.C., Akkerhuis, K.M., Staessen, J.A., Struijker-Boudier, H.A.J., Booz, G.W., Blankesteijn, W.M., 2016. CXCL10 Is a Circulating Inflammatory Marker in Patients with Advanced Heart Failure: a Pilot Study. *J Cardiovasc Transl Res* 9, 302–314. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9703-3>

Angele, M.K., Pratschke, S., Hubbard, W.J., Chaudry, I.H., 2014. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5, 12–19. <https://doi.org/10.4161/viru.26982>

Bai, B., Yang, Y., Wang, Q., Li, M., Tian, C., Liu, Y., Aung, L.H.H., Li, P., Yu, T., Chu, X., 2020. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death Dis* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02985-x>

Baldini, C., Moriconi, F.R., Galimberti, S., Libby, P., De Caterina, R., 2021. The JAK–STAT pathway: an emerging target for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis and

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab447>

Baumgarten, G., Knuefermann, P., Schuhmacher, G., Vervölgyi, V., von Rappard, J., Dreiner, U., Fink, K., Djoufack, C., Hoeft, A., Grohé, C., Knowlton, A.A., Meyer, R., 2006. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 25, 43–49. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000196498.57306.a6>

Böhm, M., Kirchmayr, R., Gierschik, P., Erdmann, E., 1995. Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. *Am J Med* 98, 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)80402-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80402-1)

Buchbinder, E.I., Desai, A., 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am J Clin Oncol* 39, 98–106. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>

Bucher, M., Kees, F., Taeger, K., Kurtz, A., 2003. Cytokines down-regulate α 1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Critical Care Medicine* 31, 566–571. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000048621.36569.69>

Burridge, P.W., Li, Y.F., Matsa, E., Wu, H., Ong, S.-G., Sharma, A., Holmström, A., Chang, A.C., Coronado, M.J., Ebert, A.D., Knowles, J.W., Telli, M.L., Witteles, R.M., Blau, H.M., Bernstein, D., Altman, R.B., Wu, J.C., 2016. Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 22, 547–556. <https://doi.org/10.1038/nm.4087>

Busch, K., Kny, M., Huang, N., Klassert, T.E., Stock, M., Hahn, A., Graeger, S., Todiras, M., Schmidt, S., Chamling, B., Willenbrock, M., Groß, S., Biedenweg, D., Heuser, A., Scheidereit, C., Butter, C., Felix, S.B., Otto, O., Luft, F.C., Slevogt, H., Fielitz, J., n.d. Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* n/a. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12763>

Cai, B., Cai, J., Luo, Y., Chen, C., Zhang, S., 2015. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. *Inflammation* 38, 1599–1608. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0135-z>

Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D’Souza, S.L., Ang, Y.-S., Schaniel, C., Lee, D.-F., Yang, L., Kaplan, A.D., Adler, E.D., Rozov, R., Ge, Y., Cohen, N., Edelmann, L.J., Chang, B., Waghray, A., Su, J., Pardo, S., Lichtenbelt, K.D., Tartaglia, M., Gelb, B.D., Lemischka, I.R., 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465, 808–812. <https://doi.org/10.1038/nature09005>

- Cautela, J., Lalevée, N., Ammar, C., Ederhy, S., Peyrol, M., Debourdeau, P., Serin, D., Dolley, Y.L., Michel, N., Orabona, M., Barraud, J., Laine, M., Bonello, L., Paganelli, F., Barlési, F., Thuny, F., 2016. Management and research in cancer treatment-related cardiovascular toxicity: Challenges and perspectives. *International Journal of Cardiology* 224, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.09.046>
- Cautela, J., Zeriuoh, S., Gaubert, M., Bonello, L., Laine, M., Peyrol, M., Paganelli, F., Lalevee, N., Barlesi, F., Thuny, F., 2020. Intensified immunosuppressive therapy in patients with immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis. *J Immunother Cancer* 8, e001887. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001887>
- Chen, G., Chelu, M.G., Dobrev, D., Li, N., 2018. Cardiomyocyte Inflammasome Signaling in Cardiomyopathies and Atrial Fibrillation: Mechanisms and Potential Therapeutic Implications. *Front Physiol* 9, 1115. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01115>
- Chen, J., Chiazza, F., Collino, M., Patel, N.S.A., Coldewey, S.M., Thiemermann, C., 2014. Gender Dimorphism of the Cardiac Dysfunction in Murine Sepsis: Signalling Mechanisms and Age-Dependency. *PLOS ONE* 9, e100631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100631>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chu, S.H., Goldspink, P., Kowalski, J., Beck, J., Schwertz, D.W., 2006. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, β -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sciences* 79, 1257–1267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.03.037>
- Clere-Jehl, R., Mariotte, A., Meziani, F., Bahram, S., Georgel, P., Helms, J., 2020. JAK–STAT Targeting Offers Novel Therapeutic Opportunities in Sepsis. *Trends in Molecular Medicine* 26, 987–1002. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.06.007>
- Cosper, P.F., Harvey, P.A., Leinwand, L.A., 2012. Interferon- γ causes cardiac myocyte atrophy via selective degradation of myosin heavy chain in a model of chronic myocarditis. *Am J Pathol* 181, 2038–2046. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.040>
- Davis, B.K., Roberts, R.A., Huang, M.T., Willingham, S.B., Conti, B.J., Brickey, W.J., Barker, B.R., Kwan, M., Taxman, D.J., Accavitti-Loper, M.-A., Duncan, J.A., Ting, J.P.-Y., 2011.

- NLRC5-dependent activation of the inflammasome. *J Immunol* 186, 1333–1337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003111>
- de Montmollin, E., Aboab, J., Mansart, A., Annane, D., 2009. Bench-to-bedside review: β -Adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 13, 230. <https://doi.org/10.1186/cc8026>
- Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E., Libert, C., 2011. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 19, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>
- Delano, M.J., Ward, P.A., 2016. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274, 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499>
- Desrois, M., Kober, F., Lan, C., Dalmasso, C., Cole, M., Clarke, K., Cozzone, P.J., Bernard, M., 2014. Effect of isoproterenol on myocardial perfusion, function, energy metabolism and nitric oxide pathway in the rat heart – a longitudinal MR study. *NMR in Biomedicine* 27, 529–538. <https://doi.org/10.1002/nbm.3088>
- Didié, M., Galla, S., Muppala, V., Dressel, R., Zimmermann, W.-H., 2017. Immunological Properties of Murine Parthenogenetic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Engineered Heart Muscle. *Front Immunol* 8, 955. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00955>
- Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Diodato, M.D., Knöferl, M.W., Schwacha, M.G., Bland, K.I., Chaudry, I.H., 2001. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 14, 162–169. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0861>
- Dong, L.W., Wu, L.L., Ji, Y., Liu, M.S., 2001. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis. *Shock* 16, 33–39. <https://doi.org/10.1097/00024382-200116010-00007>
- Duncan, D.J., Yang, Z., Hopkins, P.M., Steele, D.S., Harrison, S.M., 2010. TNF- α and IL-1 β increase Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* 47, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.02.002>
- Dunn, D.L., Bogard, W.C., Cerra, F.B., 1985. Enhanced survival during murine gram-negative bacterial sepsis by use of a murine monoclonal antibody. *Arch Surg* 120, 50–53.

<https://doi.org/10.1001/archsurg.1985.01390250044007>

Epelman, S., Liu, P.P., Mann, D.L., 2015. Role of Innate and Adaptive Immunity in Cardiac Injury and Repair. *Nat Rev Immunol* 15, 117–129. <https://doi.org/10.1038/nri3800>

EPPIHIMER, M.J., GUNN, J., FREEMAN, G.J., GREENFIELD, E.A., CHERNOVA, T., ERICKSON, J., LEONARD, J.P., 2002. Expression and Regulation of the PD-L1 Immunoinhibitory Molecule on Microvascular Endothelial Cells. *Microcirculation* 9, 133–145. <https://doi.org/10.1038/sj/mn/7800123>

Eriksson, U., Kurrer, M.O., Sebald, W., Brombacher, F., Kopf, M., 2001. Dual Role of the IL-12/IFN- γ Axis in the Development of Autoimmune Myocarditis: Induction by IL-12 and Protection by IFN- γ . *The Journal of Immunology* 167, 5464–5469. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5464>

Eschenhagen, T., 2010. Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure? *J Clin Invest* 120, 4197–4203. <https://doi.org/10.1172/JCI45251>

Fairweather, D., Cooper, L.T., Blauwet, L.A., 2013. Sex and Gender Differences in Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol* 38, 7–46. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2012.07.003>

Fairweather, D., Frisancho-Kiss, S., Yusung, S.A., Barrett, M.A., Davis, S.E., Gatewood, S.J.L., Njoku, D.B., Rose, N.R., 2004. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol* 165, 1883–1894. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63241-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63241-5)

Fatima, A., Xu, G., Shao, K., Papadopoulos, S., Lehmann, M., Arnáiz-Cot, J.J., Rosa, A.O., Nguemo, F., Matzkies, M., Dittmann, S., Stone, S.L., Linke, M., Zechner, U., Beyer, V., Hennies, H.C., Rosenkranz, S., Klauke, B., Parwani, A.S., Haverkamp, W., Pfitzer, G., Farr, M., Cleemann, L., Morad, M., Milting, H., Hescheler, J., Saric, T., 2011. In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells. *Cell Physiol Biochem* 28, 579–592. <https://doi.org/10.1159/000335753>

Finke, D., Heckmann, M.B., Salatzki, J., Riffel, J., Herpel, E., Heinzerling, L.M., Meder, B., Völkers, M., Müller, O.J., Frey, N., Katus, H.A., Leuschner, F., Kaya, Z., Lehmann, L.H., 2021. Comparative Transcriptomics of Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis Identifies Guanylate Binding Protein 5 and 6 Dysregulation. *Cancers* 13, 2498.

<https://doi.org/10.3390/cancers13102498>

Frantz, S., Falcao-Pires, I., Balligand, J., Bauersachs, J., Brutsaert, D., Ciccarelli, M., Dawson, D., de Windt, L.J., Giacca, M., Hamdani, N., Hilfiker-Kleiner, D., Hirsch, E., Leite-Moreira, A., Mayr, M., Thum, T., Tocchetti, C.G., van der Velden, J., Varricchi, G., Heymans, S., 2018. The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC. *Eur J Heart Fail* 20, 445–459. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1138>

Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.-D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T., Kelly, R.A., 1999. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 104, 271–280.

Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., Koyasu, S., 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 22, 556–560. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02005-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02005-1)

Furian, T., Aguiar, C., Prado, K., Ribeiro, R.V.P., Becker, L., Martinelli, N., Clausell, N., Rohde, L.E., Biolo, A., 2012. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. *Journal of Critical Care* 27, 319.e9-319.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.06.017>

Gannon, C.J., Pasquale, M., Tracy, J.K., McCarter, R.J., Napolitano, L.M., 2004. Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia. *Shock* 21, 410–414. <https://doi.org/10.1097/00024382-200405000-00003>

Gottumukkala, R.V., Lv, H., Cornivelli, L., Wagers, A.J., Kwong, R.Y., Bronson, R., Stewart, G.C., Schulze, P.C., Chutkow, W., Wolpert, H.A., Lee, R.T., Lipes, M.A., 2012. Myocardial Infarction Triggers Chronic Cardiac Autoimmunity in Type 1 Diabetes. *Sci Transl Med* 4, 138ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003551>

Grabie, N., Gotsman, I., DaCosta, R., Pang, H., Stavrakis, G., Butte, M.J., Keir, M.E., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., Lichtman, A.H., 2007a. Endothelial Programmed Death-1 Ligand 1 (PD-L1) Regulates CD8⁺ T-Cell-Mediated Injury in the Heart. *Circulation* 116, 2062–2071. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.709360>

Grabie, N., Lichtman, A.H., Padera, R., 2019. T cell checkpoint regulators in the heart. *Cardiovascular Research* 115, 869–877. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz025>

Grinnemo, K.-H., Löfling, M., Nathanson, L., Baumgartner, R., Ketelhuth, D.F.J., Beljanski,

- V., Davies, L.C., Österholm, C., 2019. Immunomodulatory effects of interferon- γ on human fetal cardiac mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 371. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1489-1>
- Hagiwara, S., Iwasaka, H., Maeda, H., Noguchi, T., 2009. Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock* 31, 515–520. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181863689>
- Hashiguchi, N., Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Nakamori, Y., Noborio, M., Shiozaki, T., Nishino, M., Kuwagata, Y., Shimazu, T., Sugimoto, H., 2001. Enhanced Expression of Heat Shock Proteins in Activated Polymorphonuclear Leukocytes in Patients with Sepsis. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 51, 1104–1109.
- He, Y., Hara, H., Núñez, G., 2016. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci* 41, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>
- Hobai, I.A., Aziz, K., Buys, E.S., Brouckaert, P., Siwik, D.A., Colucci, W.S., 2016. Distinct Myocardial Mechanisms Underlie Cardiac Dysfunction in Endotoxemic Male and Female Mice. *Shock* 46, 713–722. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000679>
- Hobai, I.A., Edgecomb, J., LaBarge, K., Colucci, W.S., 2015a. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. *Shock* 43, 3–15. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000261>
- Horiba, M., Kadomatsu, K., Yasui, K., Lee, J.-K., Takenaka, H., Sumida, A., Kamiya, K., Chen, S., Sakuma, S., Muramatsu, T., Kodama, I., 2006. Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* 114, 1713–1720. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.632273>
- Hsu, C., Wu, G., Yang, S.-L., Hsu, H.-K., Yang, R.-C., Tang, C., Liu, M.-S., 2007. Intracellular redistribution of dihydropyridine receptor in the rat heart during the progression of sepsis. *J Surg Res* 141, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.05.042>
- Hu, J., Roy, S.K., Shapiro, P.S., Rodig, S.R., Reddy, S.P.M., Platanias, L.C., Schreiber, R.D., Kalvakolanu, D.V., 2001. ERK1 and ERK2 Activate CCAAT/Enhancer-binding Protein- β -dependent Gene Transcription in Response to Interferon- γ *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 287–297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004885200>
- Hu, J.-R., Florido, R., Lipson, E.J., Naidoo, J., Ardehali, R., Tocchetti, C.G., Lyon, A.R., Padera, R.F., Johnson, D.B., Moslehi, J., 2019. Cardiovascular toxicities associated with

- immune checkpoint inhibitors. *Cardiovascular Research* 115, 854–868. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz026>
- Huang, L., Yao, Y., Dong, N., Yu, Y., He, L., Sheng, Z., 2011. Association of high mobility group box-1 protein levels with sepsis and outcome of severely burned patients. *Cytokine* 53, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.09.010>
- Hufnagel, G., Maisch, B., 1991. Expression of MHC class I and II antigens and the IL-2 receptor in rejection, myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 12 Suppl D, 137–140. https://doi.org/10.1093/eurheartj/12.suppl_d.137
- Ibrahim-Zada, I., Rhee, P., Gomez, C.T., Weller, J., Friese, R.S., 2014. Inhibition of sepsis-induced inflammatory response by β 1-adrenergic antagonists. *J Trauma Acute Care Surg* 76, 320–327; discussion 327–328. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000113>
- Ichinose, F., Buys, E.S., Neilan, T.G., Furutani, E.M., Morgan, J.G., Jassal, D.S., Graveline, A.R., Searles, R.J., Lim, C.C., Kaneki, M., Picard, M.H., Scherrer-Crosbie, M., Janssens, S., Liao, R., Bloch, K.D., 2007. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Nitric Oxide Synthase 3 Prevents Myocardial Dysfunction in Murine Models of Septic Shock. *Circulation Research* 100, 130–139. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000253888.09574.7a>
- Illsley, N.P., Lamartiniere, C.A., 1981. Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity. *Endocrinology* 108, 1737–1743. <https://doi.org/10.1210/endo-108-5-1737>
- Ji, C., Roy, M.D., Golas, J., Vitsky, A., Ram, S., Kumpf, S.W., Martin, M., Barletta, F., Meier, W.A., Hooper, A.T., Sapra, P., Khan, N.K., Finkelstein, M., Guffroy, M., Buetow, B.S., 2019. Myocarditis in Cynomolgus Monkeys Following Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res* 25, 4735–4748. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4083>
- Johnson, D.B., Balko, J.M., Compton, M.L., Chalkias, S., Gorham, J., Xu, Y., Hicks, M., Puzanov, I., Alexander, M.R., Bloomer, T.L., Becker, J.R., Slosky, D.A., Phillips, E.J., Pilkinton, M.A., Craig-Owens, L., Kola, N., Plautz, G., Reshef, D.S., Deutsch, J.S., Deering, R.P., Olenchock, B.A., Lichtman, A.H., Roden, D.M., Seidman, C.E., Koralknik, I.J., Seidman, J.G., Hoffman, R.D., Taube, J.M., Diaz, L.A., Anders, R.A., Sosman, J.A., Moslehi, J.J., 2016. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine* 375, 1749–1755. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609214>
- Joulin, O., Petillot, P., Labalette, M., Lancel, S., Neviere, R., 2007. Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction. *Physiol Res* 56, 291–297.

<https://doi.org/10.33549/physiolres.930946>

Kakahana, Y., Ito, T., Nakahara, M., Yamaguchi, K., Yasuda, T., 2016. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *Journal of Intensive Care* 4, 22. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0148-1>

Kam, K.W.L., Qi, J.S., Chen, M., Wong, T.M., 2004. Estrogen Reduces Cardiac Injury and Expression of β 1-Adrenoceptor upon Ischemic Insult in the Rat Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 8–15. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.058339>

Kaur, S., Sassano, A., Joseph, A.M., Majchrzak-Kita, B., Eklund, E.A., Verma, A., Brachmann, S.M., Fish, E.N., Platanias, L.C., 2008. Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *J Immunol* 181, 7316–7323. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7316>

Kim, B.-H., Chee, J.D., Bradfield, C.J., Park, E.-S., Kumar, P., MacMicking, J.D., 2016. Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nat Immunol* 17, 481–489. <https://doi.org/10.1038/ni.3440>

Kim, S.-C., Stice, J.P., Chen, L., Jung, J.S., Gupta, S., Wang, Y., Baumgarten, G., Trial, J., Knowlton, A.A., 2009. Extracellular Heat Shock Protein 60, Cardiac Myocytes and Apoptosis. *Circ Res* 105, 1186–1195. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209643>

Kimmoun, A., Louis, H., Al Kattani, N., Delemazure, J., Dessales, N., Wei, C., Marie, P.Y., Issa, K., Levy, B., 2015. β 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock. *Crit Care Med* 43, e332-340. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001078>

Kisat, M., Villegas, C.V., Onguti, S., Zafar, S.N., Latif, A., Efron, D.T., Haut, E.R., Schneider, E.B., Lipsett, P.A., Zafar, H., Haider, A.H., 2013. Predictors of sepsis in moderately severely injured patients: an analysis of the National Trauma Data Bank. *Surg Infect (Larchmt)* 14, 62–68. <https://doi.org/10.1089/sur.2012.009>

Kitani, T., Ong, S.-G., Lam, C.K., Rhee, J.-W., Zhang, J.Z., Oikonomopoulos, A., Ma, N., Tian, L., Lee, J., Telli, M.L., Witteles, R.M., Sharma, A., Sayed, N., Wu, J.C., 2019. Human-Induced Pluripotent Stem Cell Model of Trastuzumab-Induced Cardiac Dysfunction in Patients With Breast Cancer. *Circulation* 139, 2451–2465. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037357>

Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E., Parrillo, J.E., 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by

human septic shock serum. *J Exp Med* 183, 949–958. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.949>

Kumar, Anand, Kumar, Aseem, Paladugu, B., Mensing, J., Parrillo, J.E., 2007. Transforming growth factor-beta1 blocks in vitro cardiac myocyte depression induced by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and human septic shock serum. *Crit Care Med* 35, 358–364. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000254341.87098.A4>

Lawrence, T., 2009. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>

Leinwand, L.A., 2003. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 112, 302–307. <https://doi.org/10.1172/JCI200319429>

Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique 5ème édition - broché - Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai - Achat Livre ou ebook | fnac [WWW Document], n.d. URL <https://livre.fnac.com/a9631392/Abul-K-Abbas-Les-bases-de-l-immunologie-fondamentale-et-clinique> (accessed 9.22.21).

Lew, W.Y.W., Yasuda, S., Yuan, T., Hammond, K.H., 1996. Endotoxin-induced Cardiac Depression is Associated with Decreased Cardiac Dihydropyridine Receptors in Rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28, 1367–1371. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0127>

Lin, L., Knowlton, A.A., 2014. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. *Life Sci* 100, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.062>

Liu, C.-J., Lo, J.-F., Kuo, C.-H., Chu, C.-H., Chen, L.-M., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Tzang, B.-S., Kuo, W.-W., Huang, C.-Y., 2009. Akt mediates 17beta-estradiol and/or estrogen receptor-alpha inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial cell apoptosis by suppressing the JNK1/2-NFkappaB pathway. *J Cell Mol Med* 13, 3655–3667. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00669.x>

Liu, S., Schreur, K.D., 1995. G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 268, C339–C349. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.2.C339>

Liu, S.F., Malik, A.B., 2006. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L622–L645. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00477.2005>

- Liu, Y.-C., Yu, M.-M., Shou, S.-T., Chai, Y.-F., 2017. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: Mechanisms and Treatments. *Front Immunol* 8, 1021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01021>
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour et al., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Machuki, J.O., Zhang, H.Y., Harding, S.E., Sun, H., 2018. Molecular pathways of oestrogen receptors and β -adrenergic receptors in cardiac cells: Recognition of their similarities, interactions and therapeutic value. *Acta Physiol (Oxf)* 222, e12978. <https://doi.org/10.1111/apha.12978>
- Mahmood, K., Eldeirawi, K., Wahidi, M.M., 2012. Association of gender with outcomes in critically ill patients. *Crit Care* 16, R92. <https://doi.org/10.1186/CC11355>
- Mahmood, S.S., Fradley, M.G., Cohen, J.V., Nohria, A., Reynolds, K.L., Heinzerling, L.M., Sullivan, R.J., Damrongwatanasuk, R., Chen, C.L., Gupta, D., Kirchberger, M.C., Awadalla, M., Hassan, M.Z.O., Moslehi, J.J., Shah, S.P., Ganatra, S., Thavendiranathan, P., Lawrence, D.P., Groarke, J.D., Neilan, T.G., 2018. Myocarditis in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 71, 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.037>
- Mann, D.L., 2015. INNATE IMMUNITY AND THE FAILING HEART: THE CYTOKINE HYPOTHESIS REVISITED. *Circ Res* 116, 1254–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302317>
- Marelli-Berg, F.M., Scott, D., Bartok, I., Peek, E., Dyson, J., Lechler, R.I., 2000. Activated murine endothelial cells have reduced immunogenicity for CD8⁺ T cells: a mechanism of immunoregulation? *J Immunol* 165, 4182–4189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4182>
- Martin Huertas, R., Saavedra Serrano, C., Perna, C., Ferrer Gómez, A., Alonso Gordo, T., 2019. Cardiac toxicity of immune-checkpoint inhibitors: a clinical case of nivolumab-induced myocarditis and review of the evidence and new challenges. *Cancer Manag Res* 11, 4541–4548. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S185202>
- Martin, L., Derwall, M., Al Zoubi, S., Zechendorf, E., Reuter, D.A., Thiemermann, C.,

- Schuerholz, T., 2019. The Septic Heart: Current Understanding of Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Chest* 155, 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.08.1037>
- Matson, D.R., Accola, M.A., Rehrauer, W.M., Corliss, R.F., 2018. Fatal Myocarditis Following Treatment with the PD-1 Inhibitor Nivolumab. *Journal of Forensic Sciences* 63, 954–957. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13633>
- Matsuda, N., Hattori, Y., Akaishi, Y., Suzuki, Y., Kemmotsu, O., Gando, S., 2000. Impairment of Cardiac β -Adrenoceptor Cellular Signaling by Decreased Expression of Gs in Septic Rabbits. *Anesthesiology* 93, 1465–1473. <https://doi.org/10.1097/00000542-200012000-00019>
- Mebazaa, A., De Keulenaer, G.W., Paqueron, X., Andries, L.J., Ratajczak, P., Lanone, S., Frelin, C., Longrois, D., Payen, D., Brutsaert, D.L., Sys, S.U., 2001. Activation of Cardiac Endothelium as a Compensatory Component in Endotoxin-Induced Cardiomyopathy. *Circulation* 104, 3137–3144. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100662>
- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., Proost, P., 2018. Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Front Immunol* 8, 1970. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970>
- Mohme, M., Riethdorf, S., Pantel, K., 2017. Circulating and disseminated tumour cells — mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 155–167. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.144>
- Morelli, A., Ertmer, C., Westphal, M., Rehberg, S., Kampmeier, T., Ligges, S., Orecchioni, A., D'Egidio, A., D'Ippoliti, F., Raffone, C., Venditti, M., Guarracino, F., Girardis, M., Tritapepe, L., Pietropaoli, P., Mebazaa, A., Singer, M., 2013. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA* 310, 1683–1691. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.278477>
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schömig, A., Laugwitz, K.-L., 2010. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *New England Journal of Medicine* 363, 1397–1409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908679>
- Moslehi, J.J., Salem, J.-E., Sosman, J.A., Lebrun-Vignes, B., Johnson, D.B., 2018. Rapid increase in reporting of fatal immune checkpoint inhibitor associated myocarditis. *Lancet* 391, 933. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30533-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30533-6)

- Muthu, K., Deng, J., Gamelli, R., Shankar, R., Jones, S.B., 2005. Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. *J Neuroimmunol* 158, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.08.003>
- Nagano, H., Mitchell, R.N., Taylor, M.K., Hasegawa, S., Tilney, N.L., Libby, P., 1997. Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest* 100, 550–557.
- Nemoto, S., Vallejo, J.G., Knuefermann, P., Misra, A., Defreitas, G., Carabello, B.A., Mann, D.L., 2002. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H2316–2323. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00763.2001>
- Neviere, R., Hassoun, S.M., Decoster, B., Bouazza, Y., Montaigne, D., Maréchal, X., Marciniak, C., Marchetti, P., Lancel, S., 2010. Caspase-dependent protein phosphatase 2A activation contributes to endotoxin-induced cardiomyocyte contractile dysfunction. *Crit Care Med* 38, 2031–2036. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181eedafb>
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 2001. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* 291, 319–322. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.319>
- Obata, T., Brown, G.E., Yaffe, M.B., 2000. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28, N67–77. <https://doi.org/10.1097/00003246-200004001-00008>
- Okajima, M., Takamura, M., Taniguchi, T., 2015. Landiolol, an ultra-short-acting β 1-blocker, is useful for managing supraventricular tachyarrhythmias in sepsis. *World J Crit Care Med* 4, 251–257. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v4.i3.251>
- Okazaki, T., Tanaka, Y., Nishio, R., Mitsuiye, T., Mizoguchi, A., Wang, J., Ishida, M., Hiai, H., Matsumori, A., Minato, N., Honjo, T., 2003. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9, 1477–1483. <https://doi.org/10.1038/nm955>
- O’Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., Laurence, A., 2015a. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med* 66, 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>

- Otero-Antón, E., González-Quintela, A., López-Soto, A., López-Ben, S., Llovo, J., Pérez, L.F., 2001. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 33, 77–79. <https://doi.org/10.1159/000049698>
- Parrillo, J.E., Burch, C., Shelhamer, J.H., Parker, M.M., Natanson, C., Schuette, W., 1985. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 76, 1539–1553.
- Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D’Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N., Tallquist, M.D., 2016. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118, 400–409. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307778>
- Plosker, G.L., 2013. Landiolol: a review of its use in intraoperative and postoperative tachyarrhythmias. *Drugs* 73, 959–977. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0077-4>
- Quagliariello, V., Passariello, M., Coppola, C., Rea, D., Barbieri, A., Scherillo, M., Monti, M.G., Iaffaioli, R.V., De Laurentiis, M., Ascierto, P.A., Botti, G., De Lorenzo, C., Maurea, N., 2019. Cardiotoxicity and pro-inflammatory effects of the immune checkpoint inhibitor Pembrolizumab associated to Trastuzumab. *International Journal of Cardiology* 292, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.028>
- Reade, M.C., Yende, S., D’Angelo, G., Kong, L., Kellum, J.A., Barnato, A.E., Milbrandt, E.B., Dooley, C., Mayr, F.B., Weissfeld, L., Angus, D.C., 2009. DIFFERENCES IN IMMUNE RESPONSE MAY EXPLAIN LOWER SURVIVAL AMONG OLDER MEN WITH PNEUMONIA. *Crit Care Med* 37, 1655–1662. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819da853>
- Reifenberg, K., Lehr, H.-A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Küpper, I., Becker, C., Ott, S., Nusser, P., Yamamura, K.-I., Rechtsteiner, G., Warger, T., Pautz, A., Kleinert, H., Schmidt, A., Pieske, B., Wenzel, P., Münzel, T., Löhler, J., 2007. Interferon- γ Induces Chronic Active Myocarditis and Cardiomyopathy in Transgenic Mice. *Am J Pathol* 171, 463–472. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060906>
- Reuben, A., Macedo, M.P. de, McQuade, J., Joon, A., Ren, Z., Calderone, T., Conner, B., Wani, K., Cooper, Z.A., Tawbi, H., Tetzlaff, M.T., Padera, R.F., Durand, J.-B., Lazar, A.J., Wargo, J.A., Davies, M.A., 2017. Comparative immunologic characterization of autoimmune giant cell

<https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1361097>

Ritchie, R.H., Rosenkranz, A.C., Huynh, L.P., Stephenson, T., Kaye, D.M., Dusting, G.J., 2004. Activation of IP prostanoid receptors prevents cardiomyocyte hypertrophy via cAMP-dependent signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287, H1179–H1185. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00725.2003>

Rittirsch, D., Flierl, M.A., Ward, P.A., 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776–787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>

Romero-Becerra, R., Santamans, A.M., Folgueira, C., Sabio, G., 2020. p38 MAPK Pathway in the Heart: New Insights in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 21, E7412. <https://doi.org/10.3390/ijms21197412>

Rudiger, A., Dyson, A., Felsmann, K., Carré, J.E., Taylor, V., Hughes, S., Clatworthy, I., Protti, A., Pellerin, D., Lemm, J., Claus, R.A., Bauer, M., Singer, M., 2013. Early functional and transcriptomic changes in the myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)* 124, 391–401. <https://doi.org/10.1042/CS20120334>

Rudiger, A., Singer, M., 2007. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction: *Critical Care Medicine* 35, 1599–1608. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000266683.64081.02>

Saraiva, R.M., Hare, J.M., 2006. Nitric oxide signaling in the cardiovascular system: implications for heart failure. *Curr Opin Cardiol* 21, 221–228. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000221584.56372.dc>

Sato, R., Kuriyama, A., Takada, T., Nasu, M., Luthe, S.K., 2016. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)* 95, e5031. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005031>

Sayed, N., Ameen, M., Wu, J.C., 2019. Personalized medicine in cardio-oncology: the role of induced pluripotent stem cell. *Cardiovasc Res* 115, 949–959. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz024>

Schröder, J., Kahlke, V., Staubach, K.H., Zabel, P., Stüber, F., 1998. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 133, 1200–1205. <https://doi.org/10.1001/archsurg.133.11.1200>

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163–189.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>

Scott, M.J., Godshall, C.J., Cheadle, W.G., 2002. Jaks, STATs, Cytokines, and Sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1153–1159. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1153-1159.2002>

Segers, V.F.M., Brutsaert, D.L., De Keulenaer, G.W., 2018. Cardiac Remodeling: Endothelial Cells Have More to Say Than Just NO. *Front Physiol* 9, 382. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00382>

Seko, Y., Tsuchimochi, H., Nakamura, T., Okumura, K., Naito, S., Imataka, K., Fujii, J., Takaku, F., Yazaki, Y., 1990. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res* 67, 360–367. <https://doi.org/10.1161/01.res.67.2.360>

Seo, J.Y., Kim, D.Y., Lee, Y.S., Ro, J.Y., 2009. Cytokine production through PKC/p38 signaling pathways, not through JAK/STAT1 pathway, in mast cells stimulated with IFN γ . *Cytokine* 46, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.008>

Sharma, A., Burrridge, P.W., McKeithan, W.L., Serrano, R., Shukla, P., Sayed, N., Churko, J.M., Kitani, T., Wu, H., Holmström, A., Matsa, E., Zhang, Y., Kumar, A., Fan, A.C., Del Álamo, J.C., Wu, S.M., Moslehi, J.J., Mercola, M., Wu, J.C., 2017. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 9, eaaf2584. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2584>

Shepherd, R.E., Lang, C.H., McDonough, K.H., 1987. Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin. *Am J Physiol* 252, H410-416. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.2.H410>

Silverman, H.J., Penaranda, R., Orens, J.B., Lee, N.H., 1993. Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med* 21, 31–39. <https://doi.org/10.1097/00003246-199301000-00010>

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., Angus, D.C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Stengl, M., Bartak, F., Sykora, R., Chvojka, J., Benes, J., Krouzecky, A., Novak, I., Svirglerova,

- J., Kuncova, J., Matejovic, M., 2010. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* 38, 579–587. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cb0f61>
- Suzuki, J.-I., Ogawa, M., Futamatsu, H., Kosuge, H., Tanaka, H., Isobe, M., 2006. A cyclooxygenase-2 inhibitor alters Th1/Th2 cytokine balance and suppresses autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 40, 688–695. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.01.006>
- Suzuki, T., Morisaki, H., Serita, R., Yamamoto, M., Kotake, Y., Ishizaka, A., Takeda, J., 2005. Infusion of the β -adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats*. *Critical Care Medicine* 33, 2294–2301. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000182796.11329.3B>
- Suzuki, T., Suzuki, Y., Okuda, J., Kurazumi, T., Suhara, T., Ueda, T., Nagata, H., Morisaki, H., 2017. Sepsis-induced cardiac dysfunction and β -adrenergic blockade therapy for sepsis. *J Intensive Care* 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s40560-017-0215-2>
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., 2018. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18, 733–744. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>
- Tajiri, K., Ieda, M., 2019. Cardiac Complications in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 3. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00003>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tan, K.S., Nackley, A.G., Satterfield, K., Maixner, W., Diatchenko, L., Flood, P.M., 2007. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal* 19, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.06.007>
- Tanaka, A., Yuasa, S., Node, K., Fukuda, K., 2015. Cardiovascular Disease Modeling Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *IJMS* 16, 18894–18922. <https://doi.org/10.3390/ijms160818894>

- Tavener, S.A., Kubes, P., 2006. Cellular and molecular mechanisms underlying LPS-associated myocyte impairment. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290, H800–H806. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00701.2005>
- Tavener, S.A., Long, E.M., Robbins, S.M., McRae, K.M., Van Remmen, H., Kubes, P., 2004. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 95, 700–707. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000144175.70140.8c>
- Tay, W.T., Fang, Y.-H., Beh, S.T., Liu, Y.-W., Hsu, L.-W., Yen, C.-J., Liu, P.-Y., 2020. Programmed Cell Death-1: Programmed Cell Death-Ligand 1 Interaction Protects Human Cardiomyocytes Against T-Cell Mediated Inflammation and Apoptosis Response In Vitro. *Int J Mol Sci* 21, 2399. <https://doi.org/10.3390/ijms21072399>
- Textoris, J., Ban, L.H., Capo, C., Raoult, D., Leone, M., Mege, J.-L., 2010. Sex-related differences in gene expression following *Coxiella burnetii* infection in mice: potential role of circadian rhythm. *PLoS One* 5, e12190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012190>
- Theivanthiran, B., Evans, K.S., DeVito, N.C., Plebanek, M., Sturdivant, M., Wachsmuth, L.P., Salama, A.K.S., Kang, Y., Hsu, D., Balko, J.M., Johnson, D.B., Starr, M., Nixon, A.B., Holtzhausen, A., Hanks, B.A., 2020. A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *J Clin Invest* 130, 2570–2586. <https://doi.org/10.1172/JCI133055>
- Theuring, F., Neumann, B., Scheler, C., Jungblut, P.R., Schwab, K., 2018. Sex differences in murine myocardium are not exclusively regulated by gonadal hormones. *J Proteomics* 178, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.005>
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., Sharpe, A.H., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6)
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D.J., 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Ullrich, R., Scherrer-Crosbie, M., Bloch, K.D., Ichinose, F., Nakajima, H., Picard, M.H., Zapol, W.M., Quezado, Z.M., 2000. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation* 102, 1440–1446.

<https://doi.org/10.1161/01.cir.102.12.1440>

van de Sandt, A.M., Windler, R., Gödecke, A., Ohlig, J., Zander, S., Reinartz, M., Graf, J., van Faassen, E.E., Rassaf, T., Schrader, J., Kelm, M., Merx, M.W., 2013. Endothelial NOS (NOS3) impairs myocardial function in developing sepsis. *Basic Res Cardiol* 108, 330. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0330-8>

Vieillard-Baron, A., Caille, V., Charron, C., Belliard, G., Page, B., Jardin, F., 2008. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Critical Care Medicine* 36, 1701. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318174db05>

Waliany, S., Lee, D., Witteles, R.M., Neal, J.W., Nguyen, P., Davis, M.M., Salem, J.-E., Wu, S.M., Moslehi, J.J., Zhu, H., 2021. Immune Checkpoint Inhibitor Cardiotoxicity: Understanding Basic Mechanisms and Clinical Characteristics and Finding a Cure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 61, 113–134. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023451>

Wang, C., Lin, J., Wang, Y., Hsi, D.H., Chen, J., Liu, T., Zhou, Y., Ren, Z., Zeng, Z., Cheng, L., Ge, J., 2021. Case Series of Steroid-Resistant Immune Checkpoint Inhibitor Associated Myocarditis: A Comparative Analysis of Corticosteroid and Tofacitinib Treatment. *Front Pharmacol* 12, 770631. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.770631>

Wang, D.Y., Salem, J.-E., Cohen, J.V., Chandra, S., Menzer, C., Ye, F., Zhao, S., Das, S., Beckermann, K.E., Ha, L., Rathmell, W.K., Ancell, K.K., Balko, J.M., Bowman, C., Davis, E.J., Chism, D.D., Horn, L., Long, G.V., Carlino, M.S., Lebrun-Vignes, B., Eroglu, Z., Hassel, J.C., Menzies, A.M., Sosman, J.A., Sullivan, R.J., Moslehi, J.J., Johnson, D.B., 2018. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Oncol* 4, 1721–1728. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.3923>

Wang, J., Okazaki, I.-M., Yoshida, T., Chikuma, S., Kato, Y., Nakaki, F., Hiai, H., Honjo, T., Okazaki, T., 2010. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int Immunol* 22, 443–452. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq026>

Wang, Yiyang, Wang, Yuan, Yang, D., Yu, X., Li, H., Lv, X., Lu, D., Wang, H., 2015. β 1-adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and I κ B α phosphorylation. *Crit Care* 19, 76. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0820-1>

Wang, Z., Wu, Q., Nie, X., Guo, J., Yang, C., 2016. Infusion of esmolol attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *J Surg Res* 200, 283–289.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.07.015>

Warren, C.R., O’Sullivan, J.F., Friesen, M., Becker, C.E., Zhang, X., Liu, P., Wakabayashi, Y., Morningstar, J.E., Shi, X., Choi, J., Xia, F., Peters, D.T., Florido, M.H.C., Tsankov, A.M., Duberow, E., Comisar, L., Shay, J., Jiang, X., Meissner, A., Musunuru, K., Kathiresan, S., Daheron, L., Zhu, J., Gerszten, R.E., Deo, R.C., Vasan, R.S., O’Donnell, C.J., Cowan, C.A., 2017. Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Enables Functional Validation of GWAS Variants in Metabolic Disease. *Cell Stem Cell* 20, 547-557.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.01.010>

Wei, C., Louis, H., Schmitt, M., Albuisson, E., Orlowski, S., Levy, B., Kimmoun, A., 2016. Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Critical Care* 20, 407. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1580-2>

Wu, L.-L., Yang, S.-L., Yang, R.-C., Hsu, H.-K., Hsu, C., Dong, L.-W., Liu, M.-S., 2003. G Protein and Adenylate Cyclase Complex-Mediated Signal Transduction in the Rat Heart During Sepsis. *Shock* 19, 533–537. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000055816.40894.cd>

Xie, W., Xiao, S., Huang, Y., Sun, X., Zhang, Z., 2019. Effect of tofacitinib on cardiovascular events and all-cause mortality in patients with immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 11, 1759720X19895492. <https://doi.org/10.1177/1759720X19895492>

Xu, H., Su, Z., Wu, J., Yang, M., Penninger, J.M., Martin, C.M., Kvietys, P.R., Rui, T., 2010. The alarmin cytokine, high mobility group box 1, is produced by viable cardiomyocytes and mediates the lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction via a TLR4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway. *J Immunol* 184, 1492–1498. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902660>

Zamami, Y., Niimura, T., Okada, N., Koyama, T., Fukushima, K., Izawa-Ishizawa, Y., Ishizawa, K., 2019. Factors Associated With Immune Checkpoint Inhibitor–Related Myocarditis. *JAMA Oncology* 5, 1635–1637. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3113>

Zellweger, R., Wichmann, M.W., Ayala, A., Stein, S., DeMaso, C.M., Chaudry, I.H., 1997. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med* 25, 106–110. <https://doi.org/10.1097/00003246-199701000-00021>

Zhan, R.-Z., Rao, L., Chen, Z., Strash, N., Bursac, N., 2021. Loss of sarcomeric proteins via upregulation of JAK/STAT signaling underlies interferon- γ -induced contractile deficit in

engineered human myocardium. *Acta Biomaterialia* 126, 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.007>

Zhang, W., Liu, H.T., 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>

Zhu, H., Shan, L., Peng, T., 2009. Rac1 mediates sex difference in cardiac tumor necrosis factor- α expression via NADPH oxidase-ERK1/2/p38 MAPK pathway in endotoxemia. *J Mol Cell Cardiol* 47, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.05.002>

Zou, L., Feng, Y., Chen, Y.-J., Si, R., Shen, S., Zhou, Q., Ichinose, F., Scherrer-Crosbie, M., Chao, W., 2010. Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 38, 1335–1342.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d99e67>