

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
INSERM UMR_S 1260 – Nanomédecine Régénérative

THÈSE présentée par :

Hamid MERDJI

soutenue le : 25 octobre 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie

**Évaluation de la sénescence endothéliale et
leucocytaire dans le choc septique**

THÈSE co-dirigée par :

M. MEZIANI Ferhat

Professeur, INSERM UMR_S 1260, Université de Strasbourg

Mme TOTI Florence

Professeur, INSERM UMR_S 1260, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BOULANGER Chantal

Directrice de recherche, INSERM UMR_S 970, Université de Paris

Mme ZAFRANI Lara

Professeur, INSERM UMR_976, Université de Paris

EXAMINATEUR INTERNE :

M. BOUCHER Philippe

Professeur, INSERM UMR_S 1109, Université de Strasbourg

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. KIMMOUN Antoine

Professeur, INSERM UMR_1116, Université de Nancy

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury, Monsieur le Professeur Boucher, Madame le Docteur Boulanger, Monsieur le Professeur Kimmoun, Madame le Professeur Schini-Kerth et Madame le Professeur Zafrani, pour avoir pris le temps de juger ce travail.

Je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Meziani et lui exprimer mon respect et ma profonde gratitude. Sa rigueur scientifique, sa détermination et sa persévérance à faire le maximum, tant au laboratoire qu'en clinique, dans l'intérêt ultime des patients, resterons toujours un modèle et une source d'inspiration pour moi.

Je souhaite remercier également Madame le Professeur Toti, co-directrice de cette thèse, pour son implication scientifique, ses remarques toujours pertinentes qui ont fait avancer le projet et sa disponibilité.

Je souhaite remercier tous mes collègues au laboratoire, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée, et sans qui je n'aurais pu mener ce travail. Parmi eux, je ne saurais comment exprimer ma gratitude au Docteur Mohamad Kassem qui a été présent tout au long de ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans le soutien de mes collègues du service de Médecine Intensive – Réanimation du Nouvel Hôpital Civil.

Je dédie ce travail à mon père et à ma mère, mes repères, mes modèles, mes premiers supporters. Merci pour votre présence, votre gentillesse, votre soutien indéfectible et surtout votre amour.

A ma merveilleuse épouse et à nos magnifiques petites filles.

A toute ma famille, aux quatre coins du monde.

A mes amis.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des abréviations	11
Introduction	15
I Genèse du concept de sepsis et de choc septique.....	16
I.A Définitions.....	18
I.A.1 Sepsis.....	18
I.A.2 Choc septique	19
I.B Étiologie	22
I.C Épidémiologie	23
I.D Sepsis et choc septique : des maladies méconnues et encore trop peu étudiées ..	24
I.E Le syndrome post-sepsis	25
II Dysfonctions immunitaires au cours du sepsis et conséquences à long terme.....	27
II.A Reconnaissance du pathogène et activation de la réponse immunitaire innée	27
II.A.1 Immunothrombose	32
II.B Réponse immunitaire adaptative	34
II.C Des réponses pro- et anti-inflammatoires concomitantes	35
II.D Immunodépression induite par le sepsis.....	38
II.E Dérégulation immunitaire post-sepsis	39
II.F Immunosénescence.....	41
II.G Immunosénescence et infections	43
II.G.1 Immunosénescence et infections chroniques	43
II.G.2 Immunosénescence et infections aiguës.....	44
III Dysfonctions endothéliales au cours du sepsis et conséquences à long terme.....	47
III.A Généralités.....	47
III.B Glycocalyx	50
III.C Activation endothéliale au cours du sepsis	51
III.D Dysfonction endothéliale au cours du sepsis.....	55
III.D.1 Infiltration leucocytaire et stress oxygéné et nitrogéné.....	55
III.D.2 Perméabilité endothéliale dans le sepsis	56
III.D.3 Dérèglement vaso-moteur dans le sepsis	58
III.D.4 L'endothélium et la cascade de coagulation dans le sepsis	61

III.D.4.a Activation de la coagulation et coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	64
III.E Complications cardio-vasculaires post-septiques.....	66
III.E.1 Complications cardio-vasculaires à la phase aiguë et à court terme	66
III.E.2 Complications cardio-vasculaires du sepsis à long terme	70
III.E.2.a Major adverse cardiovascular events (MACEs)	70
III.E.2.b Les complications cardio-vasculaires post-sepsis, une menace émergente de santé publique	70
III.E.2.c Sénescence vasculaire, athérosclérose et inflammation.....	73
III.E.2.d Inflammageing	75
IV La sénescence	77
IV.A Généralités sur le concept de sénescence	77
IV.B Théorie de la pléiotropie antagoniste	78
IV.C Sénescence réplicative.....	79
IV.D Sénescence accélérée : un vieillissement induit par le stress	82
IV.E Caractéristiques des cellules sénescentes	83
IV.E.1 Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal)	83
IV.E.2 Arrêt du cycle cellulaire	84
IV.E.3 Senescence-associated secretory phenotype » (SASP)	86
IV.E.4 Autophagie	86
IV.E.5 Consensus de l'International Cell Senescence Association (ICSA)	87
IV.F Sénescence endothéliale et vieillissement vasculaire.....	88
IV.G Quelles sont les voies menant à la sénescence cellulaire ?	91
IV.G.1 La voie de réponse aux dommages de l'ADN	92
IV.G.2 La voie du locus INK4/ARF	94
IV.G.3 L'arrêt du cycle cellulaire	95
IV.G.4 Sénescence versus Apoptose ?	96
IV.H La sénescence prématuée induite par le stress (SIPS)	98
IV.I Le sepsis comme facteur de stress induisant une sénescence prématuée	99
IV.J Thérapies de nouvelles générations ciblant les cellules sénescentes : une solution contre les troubles cardiovasculaires post-sepsis ?	102
IV.J.1 Les sénolytiques	104
IV.J.2 Les sénostatiques.....	105
IV.J.3 Thérapie de rajeunissement (rejuvenation therapy)	106
Hypothèses et objectifs.....	108
Travaux personnels	112
I Article 1.....	113
II La sénescence endothéliale au niveau cellulaire	124

II.A	Objectifs	124
II.B	Matériels et méthodes.....	124
II.B.1	Modalité d'isolement et de culture des cellules endothéliales d'artères coronaires porcines.....	124
II.B.2	Stimulations mimant un sepsis	125
II.B.3	Évaluation de la sénescence	126
II.C	Résultats	127
III	La sénescence endothéliale et leucocytaire dans le choc septique chez l'Homme	129
III.A	Sénescence endothéliale et choc septique	129
III.B	Objectifs	130
III.C	Matériels et méthodes.....	130
III.C.1	Isolement des CEC en cytométrie en flux : mise au point d'un premier panel	
	132	
III.C.2	Isolement des CEC en cytométrie en flux : mise au point d'un second panel	
	136	
III.C.3	Isolement des CEC par immuno-séparation Magnétique et mise au point d'un marqueur de sénescence.....	138
III.D	Sénescence leucocytaire et choc septique	141
III.E	Objectifs	141
III.F	Matériels et méthodes.....	142
IV	Article 2 : Revue de la littérature	148
Discussion	167	
Conclusion et perspectives	182	
Références	185	
Annexes	223	
I	Annexe 1	224
II	Annexe 2	226
III	Annexe 3	228
Résumé	230	
Résumé en anglais.....	230	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Score SOFA (Sepsis-related Organ Failure assessment).	19
Tableau 2 : Expression des TLRs selon la localisation.	52
Tableau 3 : Comparaison de la sénescence cellulaire avec la quiescence.	85
Tableau 4 : Principaux composants du SASP endothérial.	90
Tableau 5 : Études de la sénescence induite par le sepsis dans des modèles <i>in-vitro</i>....	101
Tableau 6 : Études de la sénescence induite par le sepsis dans des modèles <i>in vivo</i>.	102

Liste des figures

Figure 1 : Illustration des critères diagnostiques du sepsis et du choc septique.	20
Figure 2 : Principales différences clés dans la physiologie murine et humaine qui affectent la réponse au sepsis.	21
Figure 3 : Récepteurs de surface cellulaire et intracellulaire (PRRs) responsables de la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs (ou alarmines).	29
Figure 4 : Activation des PRRs par des PAMPs et des DAMPs.	30
Figure 5 : Principales cellules de l'immunité innée, aspects et fonctions.	31
Figure 6 : Rôle de l'immunothrombose dans la défense immunitaire.	33
Figure 7 : La relation entre les différents stades de la réponse immunitaire.	35
Figure 8 : Réponse immunitaire de l'hôte dans le sepsis.	36
Figure 9 : Impact du sepsis sur le système immunitaire inné et adaptatif.	37
Figure 10 : Trajectoires immunitaires conceptuelles après un sepsis chez les sujets âgés.	40
Figure 11 : Conséquences de l'immunosénescence sur le système immunitaire inné et adaptatif. Issu de Feehan <i>et al.</i>, 2021.	43
Figure 12 : La génotoxine bactérienne CDT induit une SIPS et SASP des lymphocytes T.	45
Figure 13 : Mécanismes vasorelaxants dépendants de l'endothélium.	49
Figure 14 : Micrographie électronique d'un capillaire coronaire.	50
Figure 15 : Glycocalyx endothérial en condition physiologique et lors d'un sepsis.	51
Figure 16 : Activation de la cellule endothéiale.	53
Figure 17 : Cascade d'adhésion des leucocytes.	54
Figure 18 : Boucle de régulation reliant Ang1, Ang2, Tie1 et Tie2 dans les cellules endothéliales.	58
Figure 19 : Représentation schématique du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et de ses principaux dérivés.	60
Figure 20 : Expression du facteur tissulaire et initiation de la cascade de la coagulation.	62
Figure 21 : Endothélium et cascade de coagulation dans le sepsis.	65
Figure 22 : Évolution temporelle du risque cardio-vasculaire après l'apparition d'une infection aiguë.	67
Figure 23 : Mécanismes physiopathologiques favorisant la survenue de syndromes coronariens aigus au cours d'un sepsis.	69
Figure 24 : Représentation des mécanismes potentiels contribuant aux complications cardiovasculaires dues à la sénescence endothéiale accélérée après un sepsis ou un choc septique.	72
Figure 25 : La sénescence cellulaire est une cause et une conséquence de l'athérosclérose.	73
Figure 26 : Etiologies potentielles de l'inflammageing.	76
Figure 27 : Caractéristiques générales des cellules sénescentes.	80
Figure 28 : Modèle simplifié de la sénescence.	81
Figure 29 : Algorithme en trois étapes se basant sur des combinaisons de marqueurs multiples pour optimiser la détection des cellules sénescentes.	88
Figure 30 : Caractéristiques des cellules endothéliales sénescentes.	89
Figure 31 : Caractéristiques d'une cellule endothéiale sénescente dysfonctionnelle.	91
Figure 32 : Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR).	92

Figure 33 : Principales voies menant à la sénescence cellulaire.....	93
Figure 34 : Voies de signalisation orientant le choix entre l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose.	97
Figure 35 : Principales cibles des sénothérapies.....	103

Liste des abréviations

AA : acide arachidonique
AC : adenylyl cyclase
ADAMTS13 : *disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif*
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
Ang : angiopoïetine
ANRIL : *antisense non-coding RNA in the INK4 locus*
AP1 : protéine activatrice 1
APC : *activated protein C*
ARF : *ADP ribolysation factor*
ARHGAP18 : *rho GTPase activating protein 18*
ARNm : acide ribonucléique messager
AT : *antithrombin*
ATM : *ataxia-telangiectasia mutated*
ATP : adénosine triphosphate
ATR : *ataxia-telangiectasia mutated and rad3 related*
AVC : accident vasculaire cérébral
BCL 2 : *B-cell lymphoma 2*
BCR : *B cell receptor*
BK : bradykinine
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
CaM : calmoduline
CARD9 : *caspase recruitment domain containing protein 9*
CCL-2 : ligand 2 de la chimiokine
CDK : *cyclin-dependent kinase*
CDT : *cytotoxic distending toxin*
CEC : cellules endothéliales circulantes
CIC : centre d'investigation clinique
CIRCI : *critical illness-related corticosteroid insufficiency*
CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
CLP : *caecal ligation puncture*
CLT : *c-type lectin receptor*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
COX : cyclo-oxygénase
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CRP : protéine C réactive
CSF : *colony-stimulating factor*
CXCL : *chemokine (C-X-C motif) ligand*
DAMP : *damage-associated molecular pattern*
DDR : *DNA damage response*
DNA : *deoxyribonucleic acid*
dsDNA : *double-stranded deoxyribonucleic acid*
ECSOD : *endothelial cell superoxide dismutase*

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
EG : endothelial glycocalyx
eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*
ESAM : *endothelial cell-selective adhesion molecule*
ESL : *endothelial surface layer*
ET-1 : endothéline 1
FcR γ : *Fcy receptor*
FDG : *fluorescéine di-beta-D-galactopyranoside*
GCs : *guanylyl cyclase soluble*
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GTP : guanosine triphosphate
HCAEC : *human coronary artery endothelial cells*
HMGB1 : *high-mobility group protein B1*
HPMEC : *human pulmonary microvascular endothelial cells*
HSV : herpès simplex virus
ICAM-1 : *intercellular cell adhesion molecule-1*
ICSA : *international cell senescence association*
iE-DAP : *d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*
IFN : interferon
IGFBP : *insulin-like growth factor-binding protein*
IL: interleukine
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible,
JAM: junctional adhesion molecule
LBP : *lipopolysaccharide binding protein*
LFA1 : *lymphocyte function-associated antigen 1 (also known as α L β 2-integrin)*
LGP2 : *laboratory of genetics and physiology 2*
LPL : *lipoprotein lipase*
LPS : lipopolysaccharide
LY96 : *lymphocyte antigen 96*
MAC1 : *macrophage antigen 1*
MACE : *major adverse cardiovascular events*
MADCAM1 : *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MCG : *mannose-containing glycoprotein*
MCL : *mannose-capped lipoarabinomannan*
MDA5 : *melanoma differentiation-associated protein 5*
MDP : *muramyl dipeptide*
MDSC : cellules myéloïdes suppressives
MMP : *matrix metalloprotease*
MP : microparticules
MPO : myéloperoxydase
mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex*
MyD88 : *myeloid differentiation factor 88*
NCHS : *national center for health statistics*
NET : *neutrophil extracellular trap*
NF- κ B : facteur nucléaire- κ B
NIH : *national institutes of health*

NIK: *NF- κ B-inducing kinase*
NK : *natural killer*
NLR : *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*
nNOS : *neuronal NOS*
NO : oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
NO₂⁻ : nitrites
NO₃⁻ : nitrates
NOD : *nucleotide-binding oligomerization domain*
OMS : organisation mondiale de la santé
ONOO⁻ : peroxynitrite
PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*
PAMP : *pathogen associated molecular pattern*
PBMC : *peripheral blood mononuclear cell*
PBS : *phosphate-buffered saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PCT : procalcitonine
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM1 : *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1*
PEV : *platelets extracellular vesicles*
PGI2 : prostacycline
PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*
PMSI : programme de médicalisation des systèmes d'information
pRb : *retinoblastoma protein*
PRR : *pattern recognition receptors*
PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*
RAF1 : *RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*
RAGE : *advanced glycosylation end product-specific receptor*
RIG-I : *retinoic acid-inducible gene 1 protein*
RLR : *retinoic acid inducible gene 1-like receptor*
RNA : *ribonucleic acid*
RNS : espèces réactives de l'azote
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SA- β -Gal : *senescent-associated- β -galactosidase*
SAHF : *senescence-associated heterochromatic foci*
SASP : *senescent-associated secretory phenotype*
SCA : syndrome coronarien aigu
SIPS : *stress-induced premature senescence*
SOAP : *sepsis occurrence in acutely ill patients*
SOFA : *sepsis-related organ failure assessment*
Src : kinase de la famille Src
SSK1 : *senescent-specific killing compound 1*
ssRNA : *single-stranded RNA*
STING : *stimulator of interferon genes protein*
SVF : sérum de veau fœtal
SYK : *spleen tyrosine kinase*
TCR : *T cell receptor*
TDM : *trehalose-6,6'-dimycolate*

TF : *tissular factor*

TFPI : *tissue factor pathway inhibitor*

TGF- β : *transforming growth factor*

TICAM1 : *TIR domain-containing adaptor molecule 1*

TLR : *toll-like receptor*

TM : *thrombomodulin*

TNF : *tumor necrosis factor*

TRAF2 : facteur 2 associé au récepteur du TNF

TRIF : *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : *virus-induced senescence*

VLA4 : very late antigen 4 (also known as $\alpha 4\beta 1$ -integrin)

VRS : virus respiratoire syncytial

VSMC : *vascular smooth muscle cells*

VWF : *von willebrand factor*

WHO : *world health organization*

Introduction

I Genèse du concept de sepsis et de choc septique

« Sepsis » est le terme anglo-saxon employé dans le monde entier pour caractériser une réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave.

La compréhension de la physiopathologie complexe du sepsis s'est lentement développée au fil des ans. Le mot sepsis dérive du mot grec Σήψις signifiant "décomposition" ou "pourriture" et sa première utilisation documentée dans les poèmes d'Homère remonte au VIIème siècle avant Jésus-Christ. Il a ensuite été popularisé dans les travaux d'Hippocrate et de Galien au cours des siècles suivants bien que sa physiopathologie demeura longtemps largement incomprise (Funk et al., 2009).

A la fin du XVIIème siècle, un drapier Hollandais, Antonie Van Leeuwenhoek, est le premier à décrire des bactéries et autres micro-organismes en perfectionnant les microscopes de l'époque. Il nomme ces micro-organismes « animalcules » sans comprendre leur rôle. La première définition moderne en 1837 est mise au point par Pierre Piorry, un médecin français, qui crée le terme « septicémie » à partir des mots grecs Σήψις et αίμα (sang) pour désigner la présence de bactéries (voire de champignons ou de virus) dans le sang (Sakula, 1979). Ces avancées majeures font partie des jalons permettant l'émergence au début du XIXème siècle de la "théorie des germes" dont Louis Pasteur est l'un des fervents défenseurs (Pasteur, 1881). Bien que très controversée lors de sa formulation initiale, cette théorie également appelée « théorie microbienne » ou « théorie pathogénique » suggérant que de nombreuses maladies sont causées par des micro-organismes va progressivement s'imposer. Cependant, après l'arrivée des antibiotiques modernes, cette théorie se révèle insuffisante pour expliquer complètement les phénomènes observés au cours d'un choc septique. En effet, de nombreux patients décèdent malgré l'élimination totale de l'agent pathogène. C'est ainsi qu'a progressivement émergé dans les années 1970 la « théorie de l'hôte », selon laquelle la réaction inflammatoire exagérée développée par l'hôte, c'est-à-dire le patient, est tout autant responsable des symptômes du sepsis et du choc septique (Thomas, 1972).

Il faudra attendre 1992 pour que Roger Bone et ses collègues conçoivent et valident les bases de la toute première définition consensuelle du sepsis lors de la conférence de consensus associant deux sociétés savantes nord-américaines : l'*American College of Chest Physicians* et

la *Society of Critical Care Medicine* (Bone et al., 1992). Cette définition comportait les concepts de « sepsis », « sepsis sévère » et de « choc septique », reposant largement sur la prépondérance de l'inflammation avec une hypothèse de continuum entre ces trois concepts.

Suite à cette première définition, de nombreux essais cliniques ont tenté de contrôler cette inflammation exagérée associée au sepsis par des traitements anti-inflammatoires mais sans succès (Nedeva et al., 2019), soulignant une physiopathologie du sepsis finalement plus complexe. L'hypothèse d'une infection qui déclenche une réponse beaucoup plus polymorphe et prolongée : ensemble de mécanismes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires concomitants, contribuant d'une part à la clairance de l'infection et aux lésions d'organes et d'autre part à la réparation tissulaire et aux infections secondaires, était retenue (Cecconi et al., 2018).

En 2016 pour remédier à certaines limites, les critères diagnostiques ont été mis au point lors de la troisième conférence internationale de consensus sur les définitions du sepsis et du choc septique grâce au travail de la « *Society of Critical Care Medicine* » et de l'« *European Society of Intensive Care Medicine* » (Singer et al., 2016). Ces nouveaux critères de définition du sepsis se concentrent davantage sur l'évaluation des dysfonctions d'organes plutôt que sur les signes inflammatoires.

Les nouvelles définitions du sepsis et de sa présentation la plus grave, le choc septique, reposent sur l'idée que les atteintes cellulaires sous-tendent les anomalies physiopathologiques et biochimiques responsables des dysfonctions d'organes et de la mortalité.

Plusieurs raisons ont motivé la mise à jour de ces nouvelles définitions (Vincent et al., 2013). Tout d'abord, les nombreuses limites des critères utilisés dans les définitions précédentes et notamment la faible spécificité du syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) (Kaukonen et al., 2015) avec pour corolaire une caractérisation biaisée des populations enrôlées dans les essais cliniques, leur hétérogénéité expliquant en partie le nombre conséquent d'échecs de traitements qui semblaient pourtant prometteurs dans les essais de phases précoce ou en recherche préclinique (Fink & Warren, 2014; Marshall, 2014).

En effet, bien que des processus pro et anti-inflammatoires soient impliqués dans la réponse dérégulée de l'hôte, le sepsis n'est plus considéré comme un dysfonctionnement reposant uniquement sur le concept d'inflammation systémique. Enfin, la nouvelle définition propose de se baser sur un outil objectif de stratification des dysfonctions d'organes qu'est le SOFA score. Nous en abordons l'état actuel dans les parties qui suivent.

I.A Définitions

I.A.1 *Sepsis*

Le sepsis est défini comme une infection suspectée ou prouvée, le plus souvent bactérienne, responsable d'une ou plusieurs défaillances d'organes mettant en jeu le pronostic vital, consécutives à une réponse immunitaire inadaptée de l'hôte. La mortalité lors du sepsis est proche de 10 % (Seymour et al., 2016).

La dysfonction d'organe est quantifiée par le score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) (Vincent et al., 1996). Ce score, qui se quantifie de zéro à vingt-quatre points, est considéré comme positif lorsqu'il est supérieur ou égal à deux dans le sepsis. Bien corrélé à la mortalité (Seymour et al., 2016), il évalue la gravité clinique d'un sepsis sur la base de six dysfonctions d'organes distinctes : hémodynamique, respiratoire, neurologique, rénale, hépatique, et hémostatique (voir tableau 1).

Organe / Système	0	1	2	3	4
Respiration PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 ^a	≤ 100 ^a
Coagulation Plaquettes (10 ⁹ /L)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Hépatique Bilirubine (μmol/L)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
Cardiovasculaire Hypotension	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopa ≤ 5 ^b or Dobutamine (any dose)	Dopa > 5 or Epi ≤ 0.1 or Norepi ≤ 0.1 ^b	Dopa > 15 or Epi > 0.1 or Norepi > 0.1 ^b
SNC Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rénal Creatinine (μmol/L) Uries émises (mL/j)	< 110	110-170	171-299	300-440 < 500	> 440 < 200

Tableau 1 : Score SOFA (Sepsis-related Organ Failure assessment).

^a avec assistance respiratoire ; ^b catécholamines administrées pendant au moins une heure (doses en μg/kg/min). Abréviations : PAM : pression artérielle moyenne ; Dopa : dopamine ; Epi : épinephrine ; Norepi : norépinephrine ; SNC : système nerveux central. **D'après Vincent, et al. 1996.**

I.A.2 Choc septique

Le choc septique est la forme la plus sévère d'une infection. Il se définit par l'association d'un sepsis auquel s'ajoutent deux critères :

- une hypotension artérielle réfractaire à un remplissage « adéquat » nécessitant un recours aux vasopresseurs intraveineux pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure ou égale à 65 mmHg,
- une hyperlactatémie supérieure à 2 mM.

En s'appuyant sur les critères de choc septique de cette nouvelle définition, les experts ont évalué la mortalité à environ 40 % en se basant sur des cohortes américaines rétrospectives de plusieurs dizaines de milliers de patients (Singer et al., 2016). Ce taux de mortalité est retrouvé dans des études prospectives reposant sur ces nouveaux critères (Vincent et al., 2019). Bien que d'autres études prospectives récentes, se référant aussi à la nouvelle définition retrouvent des taux de mortalité plus proches de 50 % (Russell et al., 2017). La mortalité reste donc difficile à évaluer avec précision. Un autre biais d'évaluation des taux de mortalité est le fait que dans les études contrôlées randomisées, il est habituel de ne pas

inclure de patients moribonds chez qui les traitements évalués ne sauraient être efficaces. Ceci aboutit à une sous-évaluation de la mortalité du choc septique habituelle dans ces travaux.

Même si elle reste encore très importante, la mortalité à tout de même énormément diminuée durant les dernières décennies puisque les taux de décès hospitaliers pour choc septique étaient souvent proche de 80 % durant les années 1970 (Friedman et al., 1998).

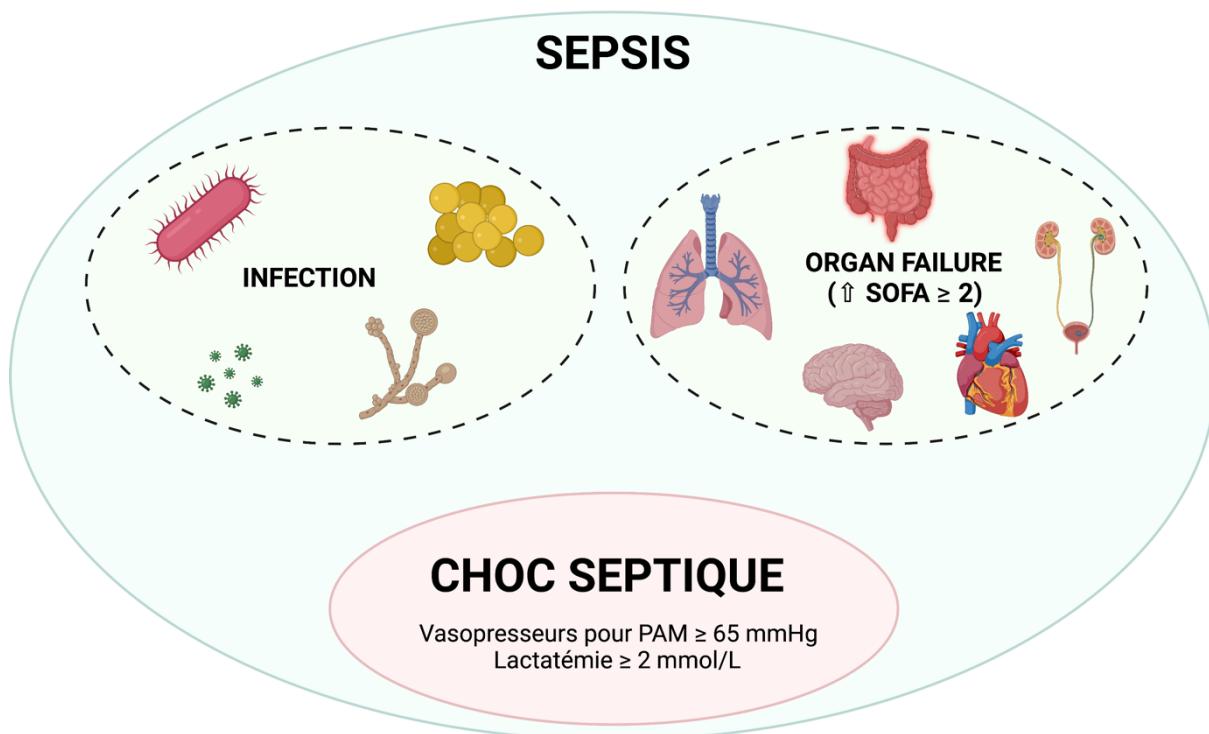


Figure 1 : Illustration des critères diagnostiques du sepsis et du choc septique.
Adapté de Singer et al., 2016.

Bien qu'une partie des nombreux échecs des études interventionnelles de ces dernières décennies dans le sepsis repose partiellement sur un problème de définition, une partie de ces échecs semble, entre autres, attribuable au fossé existant entre les modèles d'études précliniques chez le petit animal et chez l'homme. En effet, au cours des trente dernières années, en utilisant des souris génétiquement modifiées ou des animaux traités par des anticorps ou des médicaments ciblant une molécule donnée, les chercheurs ont réussi à démontrer la contribution délétère d'un grand nombre d'acteurs et de voies moléculaires au cours du sepsis, et les conséquences bénéfiques de leur neutralisation. Cependant, aucune de

ces études n'a donné lieu à des essais cliniques positifs. Une des explications semble liée à la valeur prédictive limitée des modèles précliniques dans le sepsis (Plenge et al., 2013). Il importe pour cela de bien connaître les différences significatives qui existent entre les modèles murins et humains, non seulement en termes de physiologie mais aussi en ce qui concerne la réponse à l'agression d'un pathogène lors du sepsis (Figure 2) (Cavaillon et al., 2020).

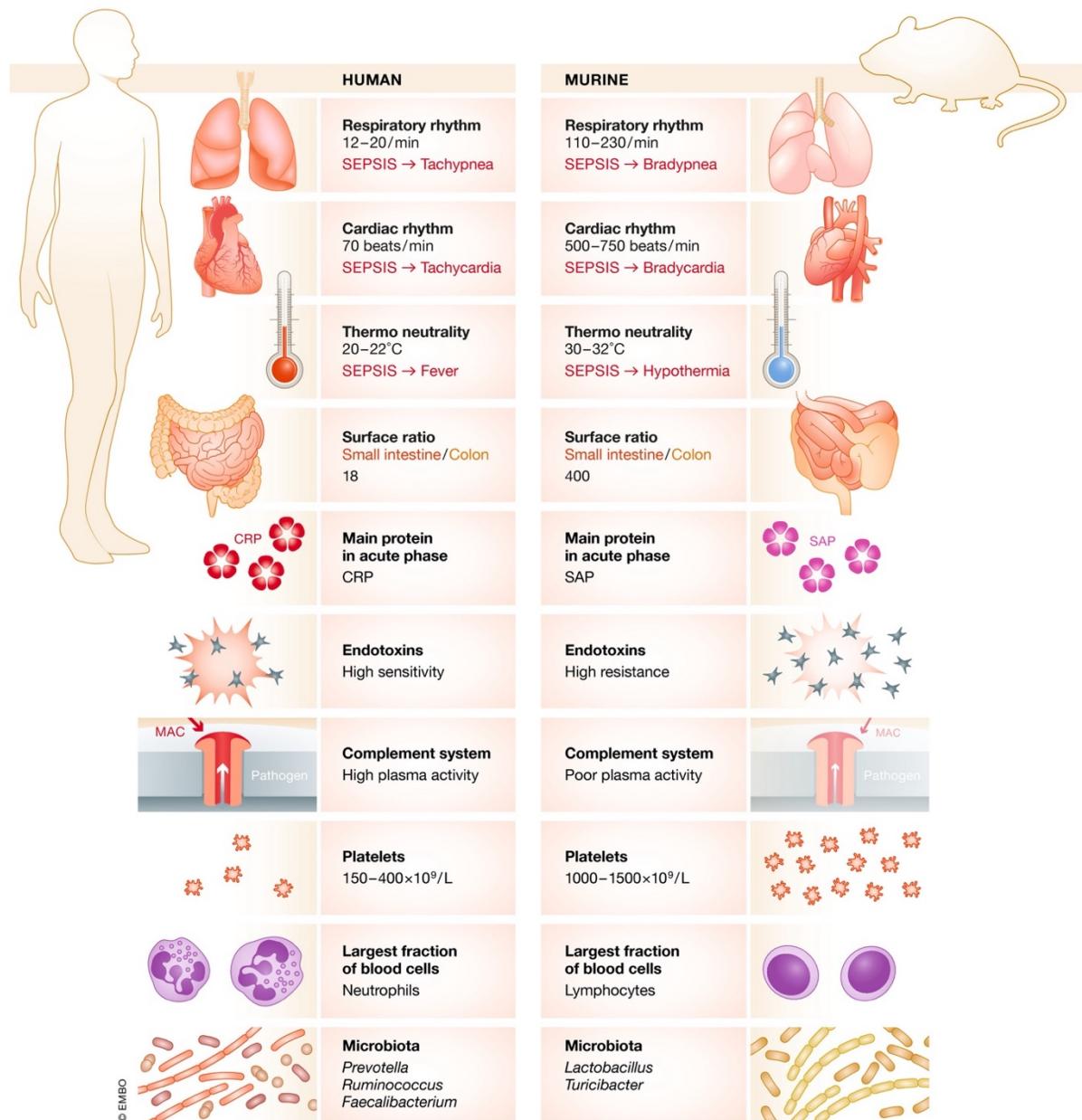


Figure 2 : Principales différences clés dans la physiologie murine et humaine qui affectent la réponse au sepsis.

(CRP: C-reactive protein ; MAC: membrane attack complex ; SAP: serum amyloid protein). Issu de Cavaillon et al., 2020.

Enfin, à ce jour, il n'existe toujours aucun marqueur biologique qui soit spécifique du sepsis ou du choc septique (Kyriazopoulou et al., 2021). Bien qu'une hyperlactatémie soit impliquée dans la définition du choc septique, ce marqueur totalement aspécifique traduit surtout une hypoxie et une hypoperfusion tissulaire. Des biomarqueurs sont néanmoins utiles pour évoquer le diagnostic. Parmi ces marqueurs, les plus fréquemment utilisés par les cliniciens sont une hyperleucocytose, ou *a contrario* une leuco-neutropénie, une augmentation de la protéine C réactive (CRP) ou de la procalcitonine (PCT) (Kyriazopoulou et al., 2021). L'atteinte systémique du sepsis et du choc septique entraîne de nombreuses perturbations du bilan biologique traduisant les défaillances d'organes, que ce soit au niveau rénal, hépatique voire vasculaire pour ce qui concerne les stigmates de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). L'isolement et l'identification d'un micro-organisme pathogène demeure l'un des arguments les plus probants pour poser un diagnostic de sepsis. Cependant chez environ 40 % des patients hospitalisés en réanimation pour sepsis, aucun micro-organisme n'est identifié sur les différents prélèvements microbiologiques (Phua et al., 2013; Thorndike & Kollef, 2020).

I.B Étiologie

Pratiquement n'importe quel micro-organisme pathogène peut entraîner un sepsis, bien qu'une bactérie soit le plus souvent l'agent causal. Par conséquent, l'éventail des présentations de ce syndrome est très vaste et varie considérablement selon les régions géographiques. Le sepsis peut être d'origine communautaire ou nosocomiale. Environ 80 % des cas de sepsis traités à l'hôpital sont d'origine communautaire. Les sites les plus couramment concernés par les infections sont les poumons (64 % des cas), l'abdomen (20 %), la bactériémie (20 %) et enfin les voies urinaires (14 %) (Karlsson et al., 2007; Vincent et al., 2009; Vincent et al., 2006). Concernant les grandes classes bactériennes, l'étude *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients* (SOAP) a fait état d'une prévalence presque égale d'infections bactériennes à Gram positif et à Gram négatif chez les patients atteints de sepsis (Vincent et al., 2006). Plus récemment, l'étude Intensive Care Over Nations de 2012 a toutefois montré une évolution, puisque les infections bactériennes à Gram négatif y étaient plus fréquentes que les infections bactériennes à Gram positif aux États-Unis (Vincent et al., 2014).

I.C Épidémiologie

Au niveau mondial, un décès sur cinq serait lié au sepsis. Bien que difficile à évaluer avec certitude, surtout dans les pays en voie de développement, une publication récente estimait qu'en 2017, près de 49 millions de cas et 11 millions de décès dans le monde sont liés au sepsis selon des estimations à partir de données provenant de 195 pays, représentant alors près de 20 % de tous les décès mondiaux (Rudd et al., 2020). Aux États-Unis, d'après les dernières données, depuis 2005, environ 7 % des décès sont reliés aux sepsis (Prest et al., 2021).

En Europe et en Amérique du Nord, on estime que le choc septique représente environ 10 % des patients admis en réanimation selon une méta-analyse compilant 71 articles observationnels parus entre 2005 et 2018 (Vincent et al., 2019).

En France, bien que durant les dernières années la plus grande étude épidémiologique estimait le nombre de chocs septiques à un peu plus de 30 000 cas par an à l'échelle nationale (Quenot et al., 2013), une évaluation plus récente semble indiquer un nombre en réalité trois fois supérieur à ces estimations. En effet, en se basant sur le P.M.S.I. (Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information) qui est un outil de description et de mesure médico-économique de l'activité hospitalière française, les données rapportent environ 95 000 chocs septiques en 2015, soit une incidence de 171 pour 100 000 habitants par an. Cette étude rapporte un nombre de 130 000 sepsis la même année, soit une incidence de 243 pour 100 000 habitants par an (Dupuis et al., 2020). A noter, dans cette même étude, en comparaison à l'année 2010, en à peine 5 ans ces chiffres sont en augmentation d'environ 25 % pour le nombre de sepsis et de 35 % pour le nombre de chocs septiques.

L'incidence du sepsis et du choc septique est ainsi en constante augmentation à l'échelle mondiale. Elle risque fortement de poursuivre sa progression dans le futur, du fait notamment *i.* du vieillissement de la population : l'organisation mondiale de la santé (OMS) prédit une augmentation de la population des plus de 60 ans sur la planète d'environ 900 millions à ce jour à environ 2 milliards en 2050 ((WHO), 2018) ; *ii.* de l'augmentation des comorbidités des patients de mieux en mieux soignés (notamment par des traitements immunosupresseurs) ; mais aussi *iii.* de l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Giacomini et

al., 2021). A titre d'exemple, selon les critères retenus pour le choc septique aux États-Unis, l'incidence pourrait augmenter dans le futur de 5 % à 20 % par an (Kadri et al., 2017).

I.D Sepsis et choc septique : des maladies méconnues et encore trop peu étudiées

En somme, loin d'être anecdotique, le sepsis est un enjeu majeur de santé publique. Il est fréquent, grave sur le court terme et sur le long terme, avec une incidence en constante augmentation.

Pourtant, ni la résolution de l'OMS de 2017 qui a fait du sepsis une priorité de santé au niveau mondial (Reinhart et al., 2017), ni la mise en place du *World Sepsis Day* depuis 2012 n'ont permis une meilleure connaissance du sepsis par le grand public. A titre d'exemple, en 2014, un sondage *Opinion Way* révélait que 90 % des Français n'avaient « jamais » entendu parler de « sepsis ».

Côté recherche, cette maladie n'est toujours pas une priorité comparativement à d'autres affections. Alors que dans les pays industrialisés, le sepsis touche presque 2 fois plus de personnes que les maladies cardiaques et représente environ 13 % des coûts hospitaliers aux États-Unis (Paoli et al., 2018), les fonds investis en recherche sur le sepsis dans ce même pays en 2020 étaient plus de 10 fois moindres que ceux affectés pour les maladies du cœur (National Institutes of Health (NIH) and National Center for Health Statistics (NCHS), 2021).

L'enjeu de santé publique est pourtant renforcé par les coûts pesant sur le système de santé. Les coûts médians d'un séjour hospitalier en France s'élevant à 11 400 € pour les patients atteints de sepsis et à 16 439 € pour les patients atteints de choc septique (Dupuis et al., 2020). Aux États-Unis, le coût moyen d'une hospitalisation est de 16 324 \$ pour sepsis et jusqu'à 38 298 \$ pour un choc septique. La présence ou non d'un sepsis à l'admission à l'hôpital est l'un des facteurs majeurs rentrant en jeu dans le coût direct d'une hospitalisation. En effet, le coût moyen d'une hospitalisation pour un sepsis présent dès l'admission représente environ 18 000 \$ alors que lorsque le sepsis se développe durant l'hospitalisation, le coût moyen atteint un peu plus de 50 000 \$. En termes de santé publique aux États-Unis, le coût direct annuel est

d'environ 22 milliards de dollars US pour les sepsis et d'environ 19,8 milliards de dollars US pour le choc septique (Paoli et al., 2018).

I.E Le syndrome post-sepsis

Le sepsis n'est pas seulement grave durant la phase aiguë, il impacte également durablement le pronostic des patients à long terme avec de nombreuses conséquences délétères. A cela s'ajoute le fait que l'augmentation progressive du nombre de sepsis et de chocs septiques alors que la mortalité diminue légèrement se traduit par un nombre de plus en plus important de patients survivants.

Il existe une association entre les comorbidités préexistantes et certaines conséquences à long terme du sepsis, démontrée par des méthodes statistiques robustes. Cependant, la causalité épidémiologique et les mécanismes biologiques sous-jacents ne sont pas encore totalement élucidés. Parmi ces patients convalescents, près d'un quart seront réadmis à l'hôpital dans les 30 jours suivant leur sortie (Goodwin et al., 2015) et jusque 40 % à un an (Shankar-Hari et al., 2020). Les taux de mortalité après avoir survécu à l'épisode initial de sepsis sont ainsi élevés : selon la gravité du sepsis, le taux de mortalité un an après la sortie de l'hôpital varie entre 7 et 43 % (Winters et al., 2010), et le taux de mortalité à cinq ans après un « sepsis sévère » peut atteindre 82 % chez les plus de 65 ans (Iwashyna et al., 2012). La moitié des décès après un sepsis est imputable à une ou des infections récurrentes ainsi qu'à des événements cardiovasculaires (24). Ce lourd tribut payé par les survivants du sepsis est souvent lié au "syndrome post-sepsis". Ce syndrome fait référence à l'ensemble des conséquences psychologiques et physiques à long terme décrites par les survivants à un sepsis. Au niveau psychologique cela inclut des insomnies, des cauchemars, des hallucinations, une asthénie extrême, des troubles de la concentration, une perte de l'estime de soi, une diminution des fonctions cognitives (Iwashyna et al., 2010; Prescott & Angus, 2018; Wang et al., 2021). Au niveau somatique, cela inclut des douleurs musculaires et articulaires invalidantes ainsi que des dysfonctionnements multiples affectant notamment le système immunitaire, rénal et cardiovasculaire (van der Slikke et al., 2020; Zorio et al., 2017).

Les données décrivant les conséquences à long terme du sepsis et la manière d'optimiser la santé des patients après un sepsis sont encore rares. De même, les données épidémiologiques

et les mécanismes biologiques qui sous-tendent ce phénomène ne sont pas encore totalement établis. Bien que la plupart des études médico-économiques s'intéressent aux coûts « directs » du sepsis à la phase aiguë, des travaux portent à croire que les coûts « indirects » engendrés sont en fait bien plus importants. En effet, les coûts directs concernent les ressources utilisées pour soigner un patient ce qui inclut les soins médicaux et infirmiers, les médicaments administrés, les analyses de laboratoire, les examens d'imagerie, les dispositifs de surveillance et d'autres coûts généraux associés à l'hospitalisation. Les coûts indirects peuvent être médicaux ou non médicaux : ils peuvent inclure les dépenses de santé après la sortie de l'hôpital, la mise en place d'équipements médicaux durables ou les prises en charge ambulatoires à cela s'ajoutent les pertes financières en raison des baisses de productivité dues à la maladie ou au décès durant l'hospitalisation ou le rétablissement.

De manière intéressante, deux études médico-économiques se sont intéressées à cette problématique, l'une Allemande (Schmid et al., 2002) et l'autre Suisse (Schmid et al., 2004), pour arriver à une conclusion similaire, à savoir que les coûts directs du sepsis représenteraient environ 30 % du coût total, alors que les coûts indirects environ 70 %. Ainsi, par extrapolation, les conséquences à long terme du sepsis sont estimées à environ 67 milliards de dollars US par an rien qu'aux États-Unis (Tiru et al., 2015).

Les efforts visant à réduire la morbidité et la mortalité mondiales attribuables au sepsis se sont largement concentrés sur l'amélioration de la survie à court terme, tandis qu'une attention moindre a été accordée à la morbidité tardive et aux trajectoires des maladies après la sortie de l'hôpital. À mesure que le nombre de survivants du sepsis augmente, l'identification des risques tardifs qu'encourent les survivants devient une priorité croissante.

Ce travail de thèse, en évaluant le rôle potentiel de la sénescence prématûrée induite à la fois au niveau immunitaire et au niveau cardio-vasculaire, tente d'apporter une meilleure compréhension des conséquences du sepsis à long-terme et de la physiopathologie du syndrome post-sepsis. Bien que de nombreux autres mécanismes semblent aussi impliqués, l'amélioration croissante des connaissances concernant l'impact délétère de la sénescence dans diverses pathologies mais aussi l'arrivée récente de thérapeutiques prometteuses pour en limiter les conséquences néfastes rendent ce sujet particulièrement d'actualité.

II Dysfonctions immunitaires au cours du sepsis et conséquences à long terme

Le *primum movens* de l'initiation de la réponse inflammatoire est l'interaction entre le pathogène et le système immunitaire de l'hôte. A travers ce second chapitre, nous abordons dans un premier temps le rôle de la réponse immunitaire adaptée au cours du sepsis. Puis dans un second temps, nous discutons de la potentielle implication de la sénescence dans la physiopathologie des réponses immunitaires inadaptées au sepsis et de ses conséquences à long terme.

II.A Reconnaissance du pathogène et activation de la réponse immunitaire innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Les micro-organismes pathogènes expriment un grand nombre de signatures moléculaires, dont les PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), qui permettent leur reconnaissance rapide par le système immunitaire inné (H. Kumar et al., 2011). Ces PAMPs sont des structures moléculaires souvent constitutionnelles et indispensables à la survie des pathogènes, ce qui explique leur caractère extrêmement conservé au fil de l'évolution (Mogensen, 2009). Il peut s'agir de molécules de surface comme le LPS (lipopolysaccharide), un constituant majeur de la paroi des bactéries Gram négatif, comme l'acide lipotéichoïque présent au niveau de la paroi des bactéries Gram positif ou des composants d'origine fongique comme le β -glucan, comme des composés nucléotidiques d'origine virale ou bien de molécules internes libérées lors de la lyse bactérienne (fragments d'ADN, protéines de choc thermique) (Annane et al., 2005).

La détection initiale de ces PAMPs s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), exprimés principalement par les cellules de l'immunité innée (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, etc.), mais également par des cellules ne faisant pas partie du système immunitaire comme les cellules épithéliales, endothéliales ou les fibroblastes (Takeuchi & Akira, 2010).

Les PRRs peuvent être transmembranaires, endosomaux ou intracytoplasmiques et incluent quatre grandes familles :

- les toll-like receptors (TLR) ;
- les C-type lectin receptors (CLR) ;
- les retinoic acid inducible gene 1-like receptors (RLR) ;
- les nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR).

Les PRRs les mieux connus sont les TLR dont 10 sont décrits chez l'Homme. Chaque TLR est spécifique de plusieurs PAMPs d'origine bactérienne, fongique ou virale. Mais les ligands des PRRs ne sont pas uniquement des motifs microbiens. En effet, les PRRs peuvent également alerter l'hôte de l'existence d'un danger en détectant des médiateurs endogènes libérés au cours des lésions cellulaires et tissulaires telles que les traumatismes, l'ischémie ou la nécrose. Ces médiateurs endogènes, tels que les protéines HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein*) ou S100, l'ARN et l'ADN extracellulaires ou encore les histones sont appelées « alarmines » ou *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Pugin, 2012). Ces DAMPs sont principalement relargués passivement par les cellules nécrotiques, quel que soit le phénomène ayant entraîné la mort cellulaire (infection, traumatisme, etc.), et peuvent aussi être secrétés activement, notamment par les cellules de l'immunité innée.

PAMPs et DAMPs constituent de véritables signaux de danger qui, au-delà des concepts de soi et non-soi, possèdent la capacité de déclencher rapidement une réaction immunitaire (Figure 3) (Calfee & Matthay, 2010; Hotchkiss et al., 2016). Ainsi, la fixation d'un ligand (PAMP ou DAMP) sur un TLR est à l'origine de la réponse immunitaire innée *via* l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire complexe impliquant principalement la voie de signalisation dépendante de MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) et parfois la voie dépendante de TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) (Takeuchi & Akira, 2010). Cette cascade aboutira *in fine* à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, la transcription de gènes de l'inflammation, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α [tumor necrosis factor], IL-1, IL-6...) et de molécules anti-microbiennes (oxyde nitrique ou monoxyde d'azote [NO], défensines), et initient la maturation des cellules dendritiques (Paludan et al., 2021). L'inflammasome qui est un complexe de protéines de la famille NLR est activé et favorise la mort cellulaire. Les débris cellulaires libérés (fragments d'ADN, histones) amplifient la réponse inflammatoire en prenant le rôle de DAMPs. L'ensemble de ces réponses moléculaires peut aboutir à un véritable « orage cytokinique » en cas de densités importantes

de PAMPs et DAMPs en rapport avec un inoculum bactérien et des lésions tissulaires importantes (Chousterman et al., 2017), menant à la fois à une amplification initiale de la réponse cytokinique elle-même et à la stimulation des cellules de l'immunité innée et adaptative.

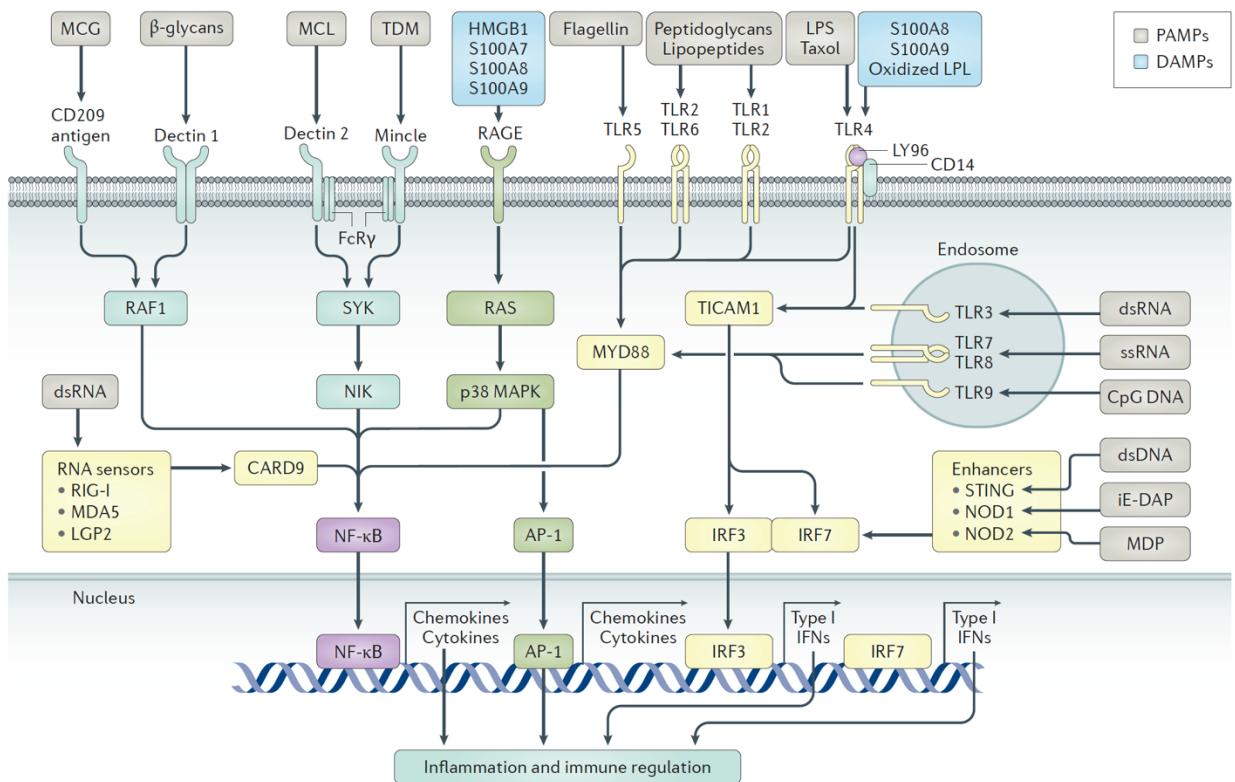


Figure 3 : Récepteurs de surface cellulaire et intracellulaire (PRRs) responsables de la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs (ou alarmines).

La plupart des TLRs forment des homodimères, à l'exception du TLR2, qui forme des hétérodimères avec soit TLR1 soit TLR6 et du TLR10 qui forme des hétérodimères avec TLR1 ou TLR2. (CARD9: caspase recruitment domain-containing protein 9 ; dsDNA: double-stranded DNA; dsRNA: double-stranded RNA; FcRγ: Fcγ receptor; HMGB1: high-mobility group protein B1; iE-DAP: d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid; LGP2: laboratory of genetics and physiology 2 (also known as DHX58); LPL: lipoprotein lipase; LPS: lipopolysaccharide; LY96: lymphocyte antigen 96; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MCG: mannose-containing glycoprotein; MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5 (also known as IFIH1); MDP: muramyl dipeptide; MCL: mannose-capped lipoarabinomannan; Mincle: also known as CLEC4E; MYD88: myeloid differentiation primary response protein 88; NIK: NF-κB-inducing kinase (also known as MAP3K14); NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; RAF1: RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RAGE: advanced glycosylation end product-specific receptor; RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1 protein (also known as DDX58); ssRNA, single-stranded RNA; STING: stimulator of interferon genes protein; SYK: spleen tyrosine kinase; TDM: trehalose-6,6'-dimycolate; TICAM1: TIR domain-containing adaptor molecule 1). **Issu de Hotchkiss et al., 2016.**

La compréhension des mécanismes d'activation de la réponse immunitaire innée par des signaux microbiens et/ou par des signaux de danger de type alarmines éclaire aujourd'hui la similitude des tableaux cliniques présentés par les patients au cours du choc septique ou dans les réactions inflammatoires dites « stériles » telles que les polytraumatismes, les pancréatites aiguës graves ou les chocs cardiogéniques en phase tardive (Figure 4) (Amarante-Mendes et al., 2018).

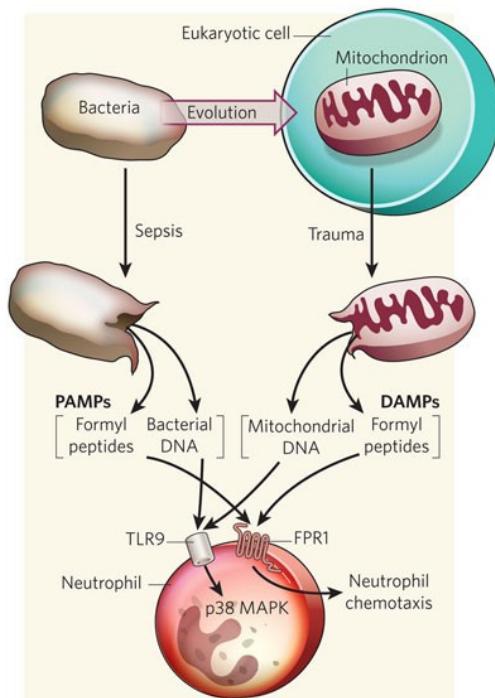


Figure 4 : Activation des PRRs par des PAMPs et des DAMPs.

Les motifs moléculaires conservés entre bactéries et mitochondries (d'origine endosymbiotique lointaine) peuvent en partie expliquer certaines similitudes entre les réponses immunitaires innées aux signaux de danger externes (PAMPs) et internes (DAMPs). (FPR1 : former activates formyl peptide receptor-1). **Issu de Calfee et al., 2010.**

Il est à noter que les cascades de signalisations intracellulaires suivant la reconnaissance de son ligand par le TLR sont partagées par les autres PRRs. Les RLR sont plutôt impliqués dans la détection de virus, alors que les CLR, exprimés à la surface des cellules dendritiques, sont capables de reconnaître des polysaccharides d'origine microbienne mais aussi des cellules nécrotiques. Certaines cytokines, notamment l'HMGB1, l'IL-1 β (inter-leukine 1 β) et l'IL-18, secrétées dans le milieu extracellulaire, amplifient la réponse immunitaire innée et

occasionnent des altérations épithéliales et endothéliales, après activation du NLR (Amarante-Mendes et al., 2018).

Le polymorphisme génétique des déterminants impliqués dans la reconnaissance du pathogène pourrait être un des éléments expliquant la susceptibilité de certains individus aux infections. Ainsi, certaines mutations impliquant TLR4 et diminuant son interaction avec le LPS ont notamment été identifiées comme facteurs de risque de choc septique en cas d'infection par un bacille gram négatif (Lorenz et al., 2002).

Une fois activées par l'intermédiaire des PRRs, les cellules de l'immunité innée vont tenter d'éliminer le pathogène par différents mécanismes directs (Figure 5) et indirects, notamment en activant le système immunitaire adaptatif.

Type de cellule	Aspect	Fonctions dans l'immunité innée	
Monocytes (sang)			
Macrophages (tissus)		<ul style="list-style-type: none"> Phagocytose Sécrétion AMPs (défensines) Présentation d'antigène Macrophages: polarisation M1 Sécrétion cytokinique 	Phagocytes professionnels
Polynucléaires neutrophiles		<ul style="list-style-type: none"> Phagocytose Libération de NETs Sécrétions AMPs (défensines, cathélicidine) 	
Cellules dendritiques		<ul style="list-style-type: none"> Phagocytose Présentation d'antigène, rôle dans l'interaction avec l'immunité adaptative Sécrétion cytokinique 	
Mastocytes		<ul style="list-style-type: none"> Vasodilatation par libération d'histamine Production d'espèces réactives de l'oxygène Sécrétions AMPs (cathélicidine) 	
Cellules lymphoïdes innées Ex: Natural Killers		<ul style="list-style-type: none"> Destruction d'agents pathogènes Sécrétion cytokines immunomodulatrices (IFN-γ) 	

Figure 5 : Principales cellules de l'immunité innée, aspects et fonctions.
Issu de « Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis » par Raphaël Clere-Jehl.

II.A.1 Immunothrombose

Un rôle moins connu du système immunitaire inné dans la réponse à l'infection est son implication dans un processus nommé « immunothrombose », couplant réactions inflammatoires et coagulation (Engelmann & Massberg, 2013). Il s'agit d'un mécanisme de défense locale de réponse intravasculaire à l'origine de la génération de thrombine et de la formation de thrombi impliquant une formation composée de fibrines, de monocytes, de neutrophiles et de plaquettes, qui contribuent ensemble à la lutte contre les pathogènes. Ce processus remplit au moins quatre fonctions physiologiques différentes (Bonaventura et al., 2021). Capturer et piéger les agents pathogènes circulant dans le sang et limiter ainsi la dissémination des agents pathogènes en retenant les micro-organismes dans le réseau de fibrines. Empêcher l'invasion des tissus par les agents pathogènes grâce à la formation de microthrombi dans les microvaisseaux permettant ainsi de contenir l'infection. Générer une compartimentalisation distincte permettant de concentrer les stratégies antimicrobiennes et leurs cibles pathogènes grâce aux thrombi intravasculaires. Favoriser le recrutement de cellules immunitaires supplémentaires sur le site de l'infection par l'accumulation microvasculaire et le dépôt de fibrinogène ou de fibrines, optimisant la reconnaissance des agents pathogènes et la coordination de la réponse immunitaire (Figure 6). A titre d'exemple, les plaquettes sont dotées de plusieurs PRRs dont certains permettant de détecter le LPS de bactéries (Aslam et al., 2006). Elles peuvent ainsi se lier activement aux bactéries en circulation et présenter ces micro-organismes aux neutrophiles et aux autres cellules immunitaires innées (Semple et al., 2007).

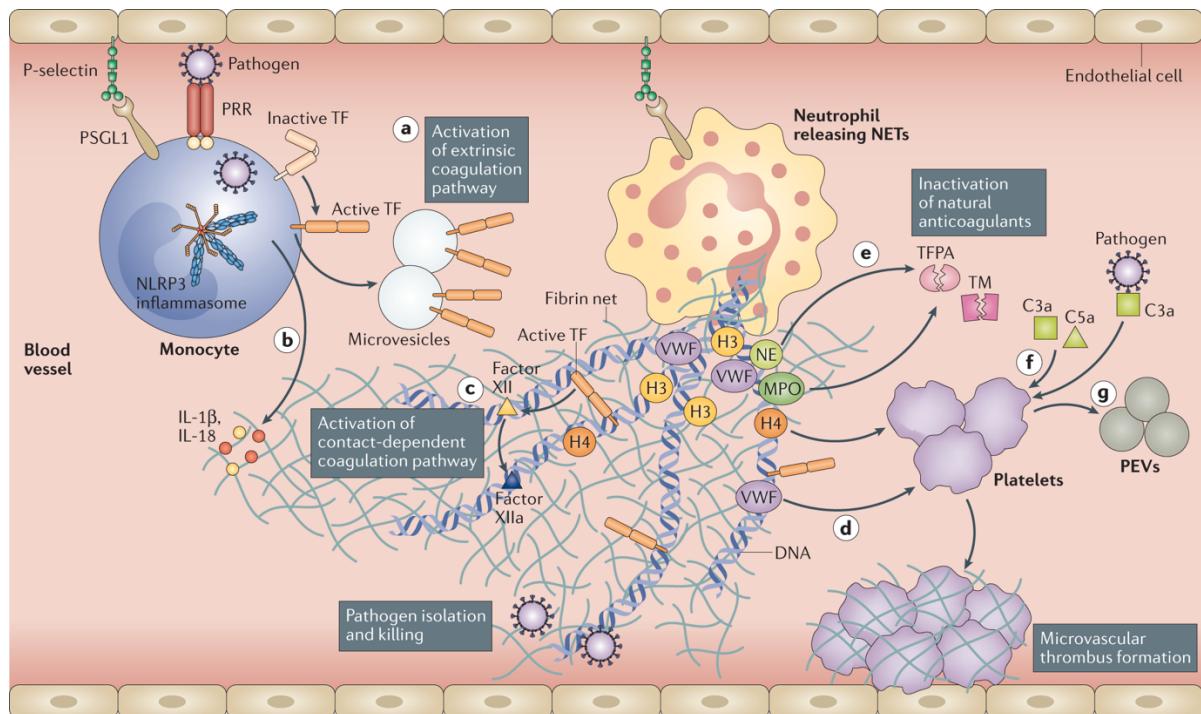


Figure 6 : Rôle de l'immunothrombose dans la défense immunitaire.

Après la reconnaissance d'un agent pathogène par les PRRs, les monocytes et les microvésicules dérivées des monocytes présentent le facteur tissulaire (TF) activé à leur surface et le libère aux sites de localisation de l'agent pathogène, activant ainsi la voie extrinsèque de la coagulation. Les neutrophiles sont recrutés et contribuent à ce processus par la libération de neutrophil extracellular traps (NET), il s'agit de filaments extracellulaires de chromatine (association d'ADN et d'histones) décondensée recouverts par de nombreuses protéines d'origine principalement granulaire. Ces NETs qui activent directement le facteur XII se lient également au facteur de von Willebrand (VWF) et contribuent au recrutement plaquettaire. Les histones, en particulier H3 et H4, déclenchent l'activation des plaquettes. En outre, l'élastase du polynucléaire neutrophile (NE) et la myéloperoxydase (MPO) présentes dans les NETs clivent et inactivent les anticoagulants naturels (tissue factor pathway inhibitor (TFPI) et thrombomoduline (TM)). Enfin, les NETs peuvent externaliser et lier le TF, favorisant l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Les plaquettes soutiennent le processus immunothrombotique en activant la voie de coagulation contact-dépendante par la libération de polyphosphates et, avec les cellules endothéliales, peuvent favoriser la génération de fibrines. Les plaquettes peuvent également être activées par C3a et C5a. Les plaquettes activées libèrent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dans des « platelet extracellular vesicles » (PEV). Grâce à ce mécanisme, des agents pathogènes sont piégés dans les NETs. **Issu de Bonaventura et al., 2021.**

La nature locale de l'immunothrombose et son apparition dans un nombre restreint de microvaisseaux garantissent probablement que l'immunothrombose ne perturbe pas profondément la perfusion globale de l'organe.

II.B Réponse immunitaire adaptative

Le deuxième temps de l'immunité repose sur la mise en jeu de l'immunité adaptative secondaire à l'activation lymphocytaire principalement médiée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Figure 7). En effet, si les lymphocytes B sont activés par une interaction directe avec l'antigène et stimulés par certaines cytokines, les lymphocytes T (T-CD4+, également appelés T auxiliaires ou Th (*T helper*) et les T-CD8+, également appelés T cytotoxiques) sont en revanche strictement dépendants des CPA. Une fois le pathogène endocyté et dégradé par une CPA, cette dernière exprime les antigènes du pathogène à sa surface en association au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 2, induisant ainsi le contact avec les lymphocytes T naïfs (ou Th0). Après contact avec leurs antigènes spécifiques exposés par les CPA, les lymphocytes naïfs se dédifférencient en lymphocytes T effecteurs Th1 et Th2, qui subissent une expansion clonale avec spécificité antigénique (Verbist et al., 2012). Les lymphocytes Th1秘ètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α ...) qui stimulent l'activité microbicide des macrophages envers les pathogènes intracellulaires. Les Th2 ont un rôle immunomodulateur par l'intermédiaire de médiateurs humoraux (IL-4, IL-5, IL-9...).

L'importance des lymphocytes T est bien mise en évidence dans les études objectivant une mortalité plus importante chez les patients septiques qui présentent une lymphopénie T (CD4 ou CD8) précoce (Rimmele et al., 2016).

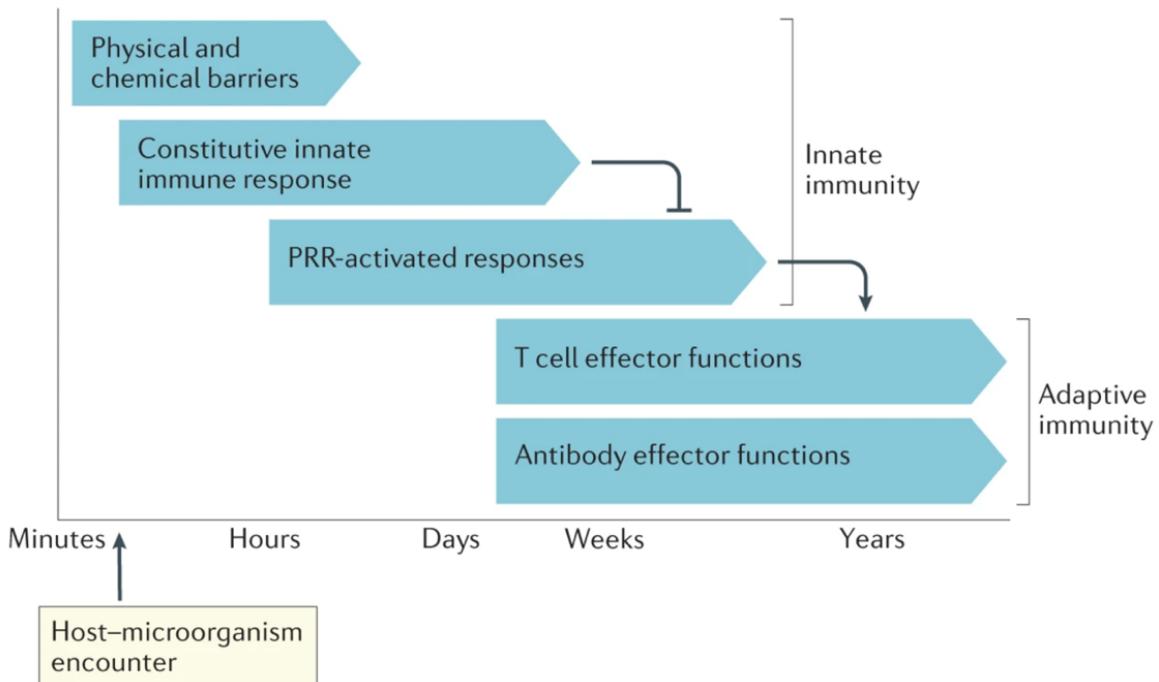


Figure 7 : La relation entre les différents stades de la réponse immunitaire.

Une première couche de défense est exercée par des barrières naturelles physiques et chimiques (peau, muqueuse, mucus, etc.). Les mécanismes immunitaires innés fonctionnent dès qu'un signal de danger est détecté et éliminent les micro-organismes nuisibles par des mécanismes spécifiques non inflammatoires qui fonctionnent indépendamment des PRRs. Cela empêche l'établissement de l'infection et l'accumulation de PAMPs, limitant ainsi l'activation des réponses immunitaires innées inductibles basées sur les PRRs. Si l'immunité basée sur les PRRs est activée, en raison du niveau de PAMPs dépassant un certain seuil, cela conduit à une inflammation et favorise l'activation de la réponse immunitaire adaptative médiée par les cellules T et les anticorps. **Issu de Paludan et al., 2021.**

II.C Des réponses pro- et anti-inflammatoires concomitantes

Historiquement, la réponse immunitaire de l'hôte au sepsis était considérée comme caractérisée par une phase hyperinflammatoire initiale qui évoluait sur plusieurs jours vers une phase immunosuppressive plus prolongée. Cependant, ce paradigme a été remis en cause par des études récentes mettant en évidence que les réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires se produisent tôt et simultanément durant le sepsis (Figure 8) (Hotchkiss et al., 2013; Jarczak et al., 2021).

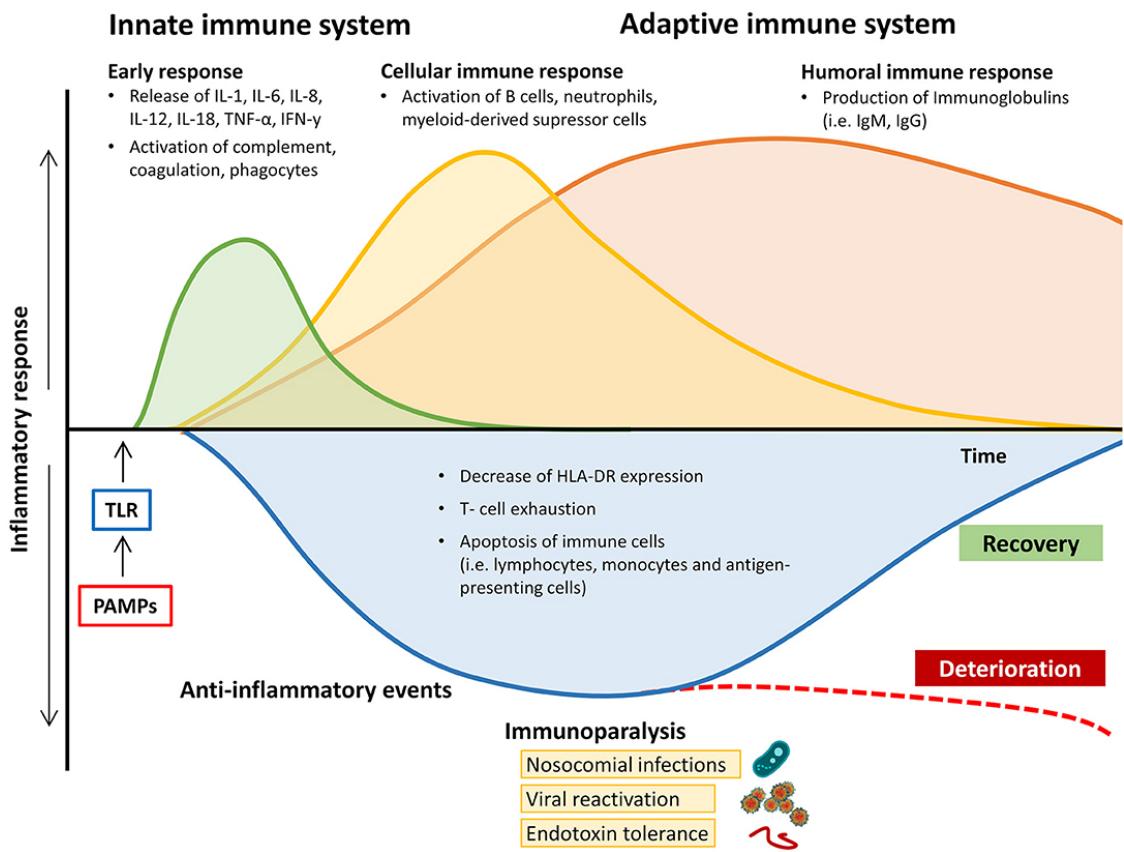


Figure 8 : Réponse immunitaire de l'hôte dans le sepsis.

L'activation des réponses immunitaires pro-inflammatoires et anti-inflammatoires se produit rapidement après le début du sepsis. **Issu de Jarczak et al., 2021.**

En effet, l'activation des voies de signalisation médiées par les PRR aboutit dès les premières heures de l'infection à la production de nombreuses cytokines inflammatoires, au premier rang desquelles figurent le TNF- α et l'IL-1 β . Ces médiateurs primaires vont induire la production et la sécrétion de nombreux médiateurs secondaires, tels que certains médiateurs lipidiques (*Platelet-Activating Factor*, prostaglandines, leucotriènes, facteur tissulaire), de nombreuses chimiokines permettant le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires au niveau du foyer infectieux (MCP-1, MCP-3, MIP-1 α), des espèces radicalaires de l'oxygène aux propriétés antimicrobiennes, du NO ou d'autres cytokines (Nedeva et al., 2019).

Concomitamment, il a été mis en évidence que des médiateurs anti-inflammatoires étaient produits en grande quantité. En effet, les cellules immunitaires prélevées de la rate ou des poumons de patients atteints de sepsis dans les 30 à 180 minutes suivant le décès présentent une production nettement réduite de cytokines pro- et anti-inflammatoires, une expression

régulée à la hausse des récepteurs inhibiteurs (y compris PD1), une expansion des populations de cellules T régulatrices (TReg) et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC), une régulation à la baisse des voies d'activation médiées par CD28 et la diminution de l'expression de HLA-DR sur les cellules présentatrices d'antigènes (Boomer et al., 2011). D'autres médiateurs anti-inflammatoires sont aussi surexprimés, on peut ainsi citer des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-4 et l'IL-10, la libération d'antagonistes endogènes du TNF- α ou de l'IL-1 β (*TNF receptors, IL-1 receptor antagonist*), l'anergie et/ou l'apoptose de nombreux effecteurs cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes T) ou l'activation du réflexe neuro-inflammatoire *via* le nerf vague (Rosas-Ballina et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats montrent que le sepsis induit de nombreux mécanismes d'immunosuppression touchant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif (Figure 9).

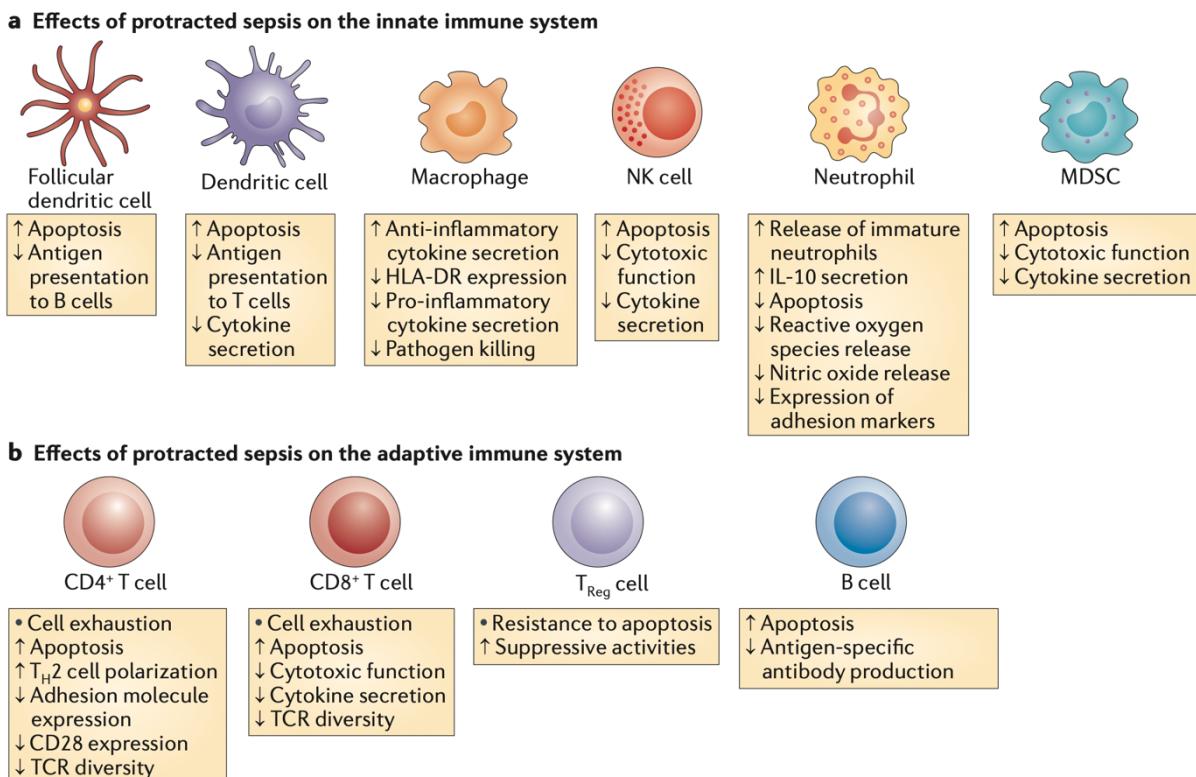


Figure 9 : Impact du sepsis sur le système immunitaire inné et adaptatif.
Issu de Hotchkiss et al., 2013.

II.D Immunodépression induite par le sepsis

De nombreuses observations suggèrent que certains patients septiques considérés comme préalablement immunocompétents vont présenter des manifestations biologiques et cliniques évocatrices d'une immunodépression acquise. Ainsi, lors du sepsis et au décours, il apparaît que la grande majorité des cellules immunitaires présentent rapidement un déficit quantitatif et/ou qualitatif (Hotchkiss et al., 2013). Cette défaillance immunologique profonde et prolongée induite par le sepsis lui-même va être notamment marquée par une augmentation importante de l'apoptose des cellules dendritiques, des NK (*natural killer*) et de toutes les sous-populations lymphocytaires, excepté les lymphocytes T régulateurs et les MDSC au profil anti-inflammatoire. De fait, au niveau qualitatif, face à une même stimulation septique, les cellules de la lignée myéloïde produiront moins de cytokines pro-inflammatoires. A titre d'exemple, les neutrophiles de patients septiques produiront moins d'espèces radicalaires de l'oxygène ou de NO, exprimeront moins de marqueurs d'adhésion et sécrèteront plus de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, que des neutrophiles de patients n'ayant pas présenté de sepsis.

Au niveau clinique, ces mécanismes d'immunodépression post-septique ou d'immuno-paralysie expliquent, en partie, la présence d'une anergie cutanée lors de tests épicutanés à des antigènes communs, ce qui témoigne d'un défaut d'hypersensibilité retardée (Meakins et al., 1977). De plus, il est fréquent d'observer la réactivation virale chez des patients en choc septique de virus jusque-là maintenus à l'état latent par le système immunitaire, tels que des réactivations de virus du groupe herpès (herpès simplex virus [HSV] et cytomégalovirus [CMV]) (Limaye et al., 2008; Luyt et al., 2007). Dans certaines études, la proportion de patients immunocompétents pouvant présenter une réactivation de CMV lors d'un séjour en réanimation pouvait atteindre 33 % (Limaye et al., 2008). Ces mécanismes expliquent aussi en partie une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et fongiques que ce soit à la phase aiguë comme les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* (Pene et al., 2012) ou à des champignons appartenant au genre *Aspergillus* (Benjamim et al., 2003), ou que ce soit à plus long terme (Zorio et al., 2017).

Les conséquences de ces mécanismes sont désormais bien connues au niveau épidémiologique. Comme mentionné précédemment, le taux de réadmission à l'hôpital chez les survivants de sepsis est extrêmement important avec pour cause principale une infection, bien que des incertitudes subsistent toujours dans ce type d'étude quant à savoir s'il s'agit d'une nouvelle infection ou d'une infection initialement mal contrôlée. Ainsi, un an après une hospitalisation en réanimation, 73 % de décès ont été rapportés à une hospitalisation initiale pour sepsis alors que la mortalité n'était que de 11 % chez les patients hospitalisés pour une cause non septique (Wang et al., 2014). Dans une méta-analyse récente analysant 56 études, la cause principale de ré-hospitalisation de patients ayant survécu à un sepsis était une infection. Ainsi, parmi les causes de réadmission durant les 30 jours suivant la sortie pour sepsis initial, le taux médian d'événements infectieux était de 49,3%, avec des proportions similaires rapportées concernant la réadmission dans les 90 jours et dans les 365 jours suivant un sepsis (Shankar-Hari et al., 2020). Par rapport à une population témoin appariée, le risque d'infection récurrente dans les années suivant un sepsis initial était multiplié par 9 chez 10 818 patients ayant survécu à une hospitalisation pour sepsis dans une étude nationale Taïwanaise (Shen et al., 2016).

Parmi les facteurs de risques spécifiques menant à une ré-admission pour une nouvelle infection, le risque de ré-hospitalisation est accru lorsque l'infection initiale concerne le site gastro-intestinal, lorsqu'il s'agit d'une infection par des bactéries dites multi-résistantes (BMR) de type bétalactamases à spectre élargi (BLSE), lorsque les scores de gravité en réanimation sont élevés et plus la durée d'hospitalisation initiale était longue (Shankar-Hari et al., 2020).

II.E Dérégulation immunitaire post-sepsis

Parmi les conséquences du sepsis, la dérégulation du système immunitaire est désormais bien établie, les causes et mécanismes qui la sous-tendent restent à ce jour incomplètement élucidés. Le phénomène de sénescence prématuée ou de sénescence induite, aussi appelé « *Stress induced premature senescence* » (SIPS) est bien décrit depuis le début des années 2000 dans de nombreux tissus comme faisant suite à un stress cellulaire intense à l'instar de ce qu'il se passe lors d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie (Toussaint et al., 2000). Le

sepsis et surtout le choc septique étant à l'origine d'un stress inflammatoire intense pourrait donc être aussi un facteur d'accélération de l'immunosénescence (Figure 10), comme ceci a déjà été démontré au cours de certaines pathologies chroniques (Bauer, 2020; Desai & Landay, 2010; Elwenspoek et al., 2017; Higdon et al., 2021; Sauce et al., 2009).

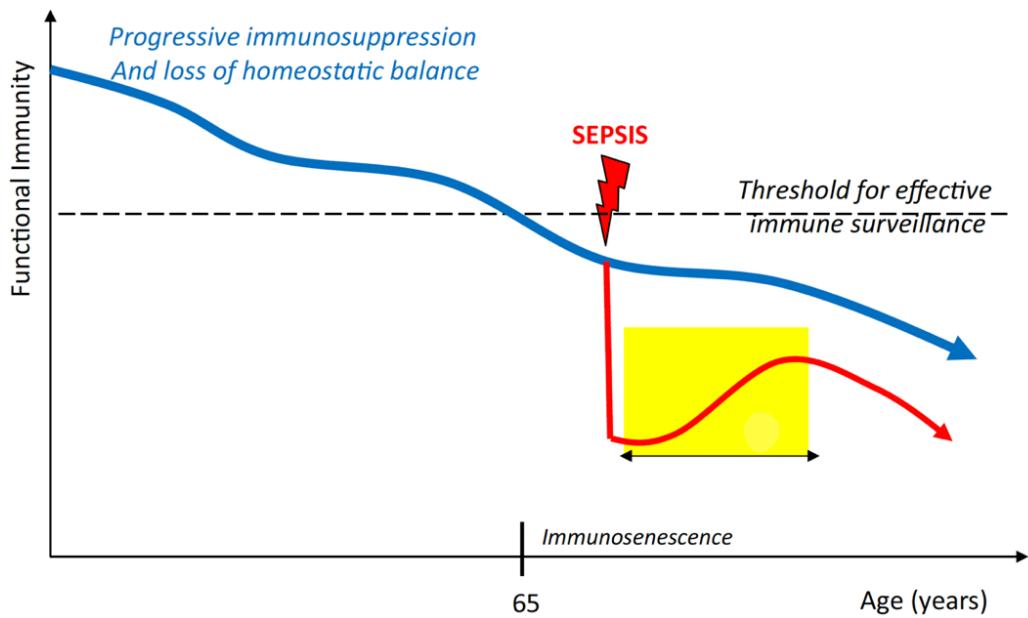


Figure 10 : Trajectoires immunitaires conceptuelles après un sepsis chez les sujets âgés.
Avec l'âge, la survenue d'une immunosénescence expose les patients à un risque d'infection constamment accru. Un sepsis pourrait amplifier l'immunosénescence et hypothétiquement modifier les trajectoires immunitaires en accélérant la pente de la diminution de l'immunité fonctionnelle chez les patients survivants. **Issu de Monneret et al., 2019.**

Une question encore débattue est la possibilité que le sepsis puisse favoriser un vieillissement précoce et prématûre du système immunitaire chez les nombreux survivants. Ainsi, en vieillissant prématûrement, le système immunitaire d'un patient post-septique, même jeune, pourrait donc se rapprocher sur le plan fonctionnel du système immunitaire d'une personne âgée. Cet état d'immunosénescence « acquise » ou « accélérée » se rapprocherait donc de l'immunosénescence « réplicative » survenant avec l'avancée en âge.

II.F Immunosénescence

L'immunosénescence est décrite comme un déclin des compétences du système immunitaire associé au vieillissement, touchant aussi bien le compartiment inné qu'adaptatif. Il s'agit d'une entité désormais bien établie qui explique, en partie, pourquoi les patients âgés présentent une plus grande sensibilité aux infections, aux tumeurs, aux maladies auto-immunes mais aussi une moins bonne réponse aux vaccins (Barbe-Tuana et al., 2020; Feehan et al., 2021). Le vieillissement impacte peu les cellules du système immunitaire inné en terme quantitatif, en revanche il entraîne de profondes modifications fonctionnelles. Ainsi, le nombre de monocytes pro-inflammatoires (CD14high/CD16+) et non conventionnels (CD14low/CD16+) augmente avec l'âge, au détriment des monocytes conventionnels (CD14+/CD16-) (Nyugen et al., 2010). Les polynucléaires neutrophiles de sujets âgés présentent une capacité réduite de chimiотaxie, de phagocytose des microbes et de sécrétion d'enzymes lytiques, ce qui diminue leur capacité de confinement de l'agent pathogène (Butcher et al., 2001). De même les cellules natural killer (NK), qui sont de lymphocytes appartenant au système immunitaire inné, deviennent progressivement dysfonctionnelles, ce qui entraîne une diminution de la cytotoxicité et une diminution de la sécrétion de facteurs chimiотactiques (Hazeldine & Lord, 2013). Enfin les cellules dendritiques, qui font partie des CPA, présentent des capacités de phagocytose et de présentation d'antigène qui diminue avec l'âge (Agrawal et al., 2012). L'ensemble de ces phénomènes aboutit non seulement à une clairance initiale diminuée des pathogènes mais aussi à une moins bonne articulation du système immunitaire inné avec le système immunitaire adaptatif (Zacca et al., 2015).

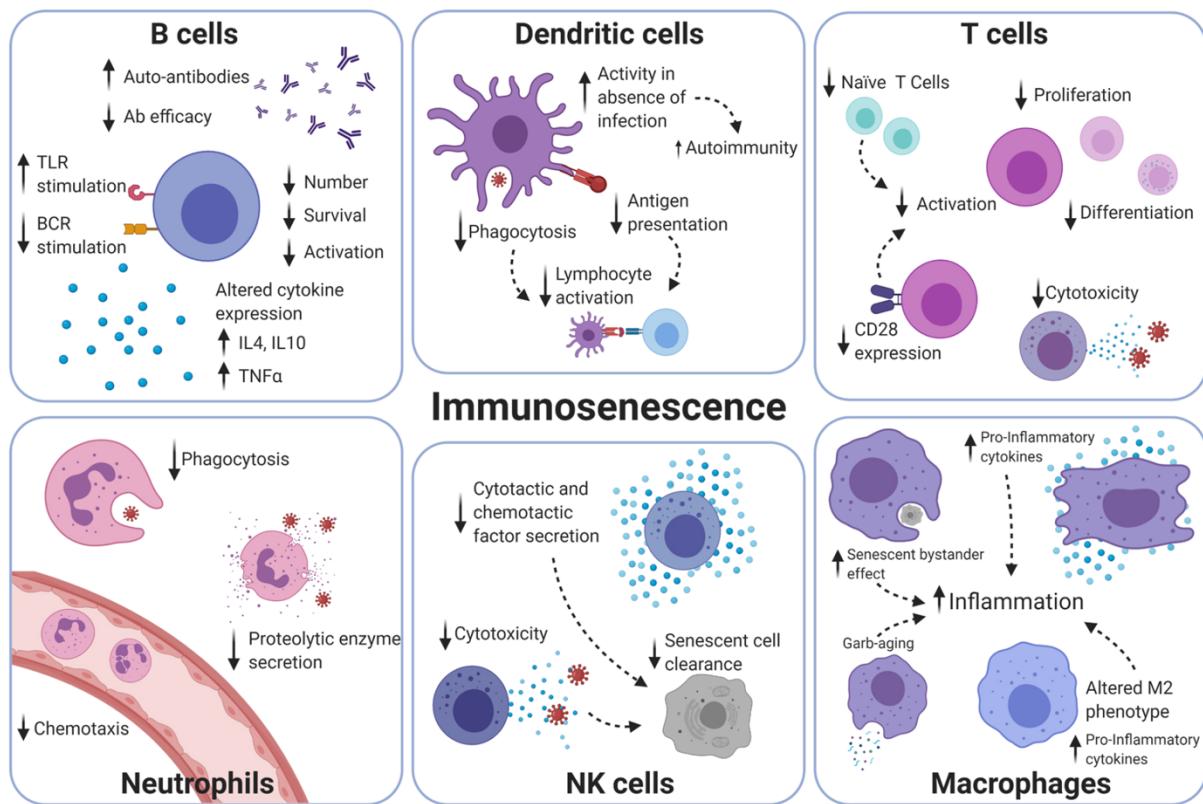
Concernant les modifications de la réponse immunitaire adaptative, elles reposent en partie sur le changement des organes lymphoïdes primaires tels que le thymus et la moelle osseuse hématopoïétique dans lesquels les progéniteurs lymphoïdes acquièrent leurs immunorécepteurs à savoir le *B cell receptor* (BCR) et le *T cell Receptor* (TCR) respectivement. En effet, avec le vieillissement se développent progressivement une involution thymique ainsi qu'une perte des capacités fonctionnelles d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques à l'origine d'un biais de développement des leucocytes vers la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde (Chinn et al., 2012).

Le vieillissement du compartiment lymphocytaire T est caractérisé par une diminution du nombre de lymphocytes T naïfs, secondaire à l'involution thymique (Zlamy et al., 2016), mais aussi un appauvrissement du répertoire T par restriction du TCR (Naylor et al., 2005). Ce récepteur a la capacité de reconnaître une infinité d'antigènes par phénomène de réarrangements géniques. Or ces taux de réarrangements diminuent au cours du vieillissement entraînant une perte de diversité du compartiment T et ainsi une moins bonne capacité à reconnaître un nouvel antigène (Britanova et al., 2014). Enfin, il existe une augmentation de la proportion de lymphocytes T mémoires oligoclonaux, particulièrement impliqués dans le contrôle d'infections virales persistantes telles que le CMV (Sansoni et al., 2008).

Concernant les lymphocytes B, l'atteinte est à la fois quantitative et qualitative. Le nombre de lymphocytes B diminue avec l'âge, en raison d'une diminution du renouvellement de la moelle osseuse et d'une réduction de la survie (Ma et al., 2019). Au cours du temps, le nombre de lymphocytes B naïfs diminue progressivement au profit des lymphocytes B mémoires qui augmentent (Kogut et al., 2012). Les cellules B âgées sont moins réactives à la stimulation du BCR, étant de plus en plus activées par les récepteurs TLR dont la spécificité est limitée et qui ont tendance à générer des réactions plus inflammatoires (Rubtsov et al., 2011). Les lymphocytes B sénescents produisent également des anticorps moins efficaces du fait d'une recombinaison de commutation de classe qui est altérée dans les cellules B mémoires (Frasca, 2018). Enfin, le profil de synthèse de cytokines est modifié, avec une augmentation de la sécrétion d'interleukines anti-inflammatoires telles que IL-4 et IL-10 (Hao et al., 2011) mais aussi de TNF- α qui est connu pour diminuer la survie des cellules pro-B qui sont les précurseurs des lymphocytes B (Ratliff et al., 2013).

L'ensemble des atteintes caractérisant l'immunosénescence expliquent en grande partie pour quelles raisons le sepsis est treize fois plus fréquent dans les populations âgées et pourquoi il est associé à deux fois plus de mortalité comparativement aux populations jeunes (Martin et al., 2006). L'immunosénescence n'explique pas tout et il existe d'autres facteurs fréquemment retrouvés chez les personnes âgées expliquant aussi une plus grande susceptibilité aux infections, tels que la dénutrition, la diminution la clairance muco-ciliaire au niveau de l'arbre bronchique respiratoire, la diminution du réflexe tussigène, etc. (Esme et al., 2019).

De manière intéressante, les défaillances immunitaires induites par le sepsis partagent de nombreuses similitudes avec l'immunosénescence des patients âgés (Figure 11) (Monneret et al., 2019).



II.G Immunosénescence et infections

II.G.1 Immunosénescence et infections chroniques

Il est désormais bien établi que les infections virales latentes, comme celles par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou par un hépadnavirus (virus de l'hépatite B ou C par exemple), sont associées à des taux accrus de lymphocytes T présentant un phénotype sénescent, indépendamment de l'âge des patients (Akbar & Henson, 2011; Deeks, 2011). Le mécanisme est cependant différent de celui d'une SIPS telle que supposée dans les modèles de sepsis aigu, en ce qu'il s'agit majoritairement de sénescence réplicative pour ces infections chroniques, dont le cas le mieux documenté à ce jour est l'infection par le VIH.

Au cours d'une infection latente au VIH, l'activation chronique du système immunitaire, liée à la réPLICATION virale persistante est à l'origine de son épuisement (Papagno et al., 2004). Premièrement, l'activation cellulaire induit la perpétuelle réPLICATION du virus dans les cellules immunitaires infectées. Deuxièmement, la réémergence d'autres virus latents, comme l'EBV (virus Epstein-Barr) ou le CMV, favorisée par la lymphopénie prédominant sur les lymphocytes T-CD4+, contribue à la persistance de stimulations antigéniques répétées. Enfin, le système immunitaire serait également suractif de manière chronique par des translocations microbiennes répétées depuis l'intestin du fait d'une déplétion massive des lymphocytes T-CD4+ au sein de la muqueuse intestinale (Brenchley et al., 2006). L'ensemble de ces causes, en déclenchant de manière récurrente la prolifération de lymphocytes T mémoires spécifiques à longue durée de vie, entraîne une érosion des télomères et, par conséquent, une sénescence réplicative.

II.G.2 Immunosénescence et infections aiguës

Très récemment, un lien entre infections bactériennes aiguës et sénescence des lymphocytes T a été mis en évidence (Mathiasen et al., 2021). L'équipe à l'origine de ce travail s'est intéressée plus spécifiquement aux effets d'une génotoxine, c'est-à-dire une toxine produite par des bactéries pathogènes dont la particularité est d'être capable de manipuler le cycle cellulaire de cellules de l'hôte. Il existe ainsi de nombreuses génotoxines bactériennes capables de bloquer ou de retarder spécifiquement la prolifération cellulaire de cellules de l'hôte avec lesquelles elles entrent en contact, dont la *cytolytic distending toxins* (CDT) qui est exprimée par de nombreuses bactéries Gram négatives dont *Escherichia coli*.

Les auteurs ont mis en évidence que la génotoxine bactérienne CDT induit une SIPS et une évolution du phénotype des lymphocytes T-CD4+ primaires activés *via* ATM (*Ataxiatelangiectasia mutated*) qui orchestre l'activation de la MAPK p38 en aval (Figure 12). Ces résultats sur des données *in-vitro* et *in vivo* contribuent de manière importante à la compréhension des propriétés immunomodulatrices des génotoxines bactériennes et donc de certains sepsis. Cependant, étant donné que les lymphocytes T sénescents induits par les génotoxines peuvent finalement mourir des effets cytotoxiques de la toxine ou être ciblés

pour une destruction à médiation immunitaire secondaire, il reste à déterminer si les génotoxines bactériennes peuvent donner lieu à des cellules T sénescentes à longue durée de vie *in vivo*.

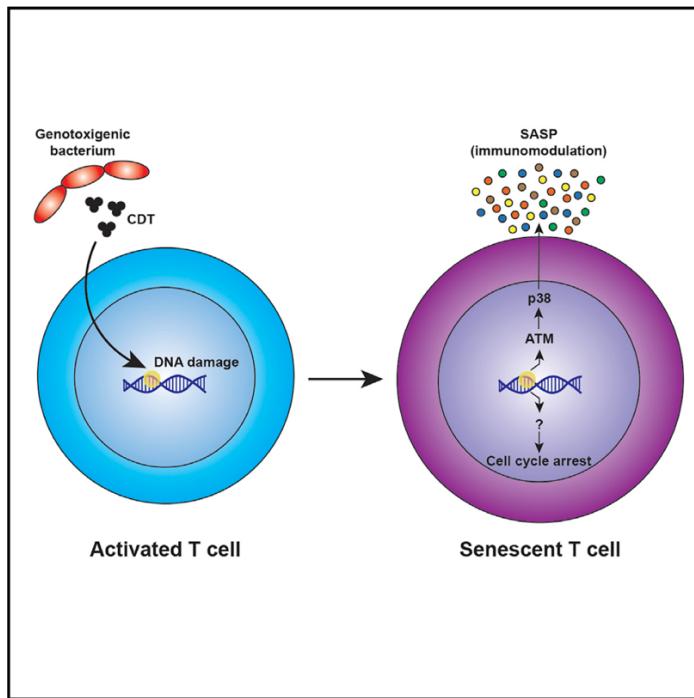


Figure 12 : La génotoxine bactérienne CDT induit une SIPS et SASP des lymphocytes T.

La génotoxine bactérienne CDT provoque une sénescence prématûre induite par le stress des lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD4 évoluent vers un profil de SASP *via* la voie ATM/p38 MAPK. (SIPS: stress-induced premature senescence ; SASP: senescent-associated secretory phenotype ; CDT : cytolethal distending toxins ; ATM: Ataxia-telangiectasia mutated). **Issu de Mathiasen et al., 2021.**

Ce travail récent d'une équipe danoise est le premier à mettre en évidence un lien entre sepsis et immunosénescence accélérée. Lors de l'initiation de mon travail de thèse, ces données n'étaient pas encore connues mais faisaient partie de notre hypothèse de départ. Notre travail en s'intéressant à l'impact du choc septique sur l'immunosénescence, et non seulement aux CDT qui ne sont pas synthétisées par toutes les bactéries, apporte donc un axe complémentaire à ce travail pionnier. L'évaluation de la sénescence immunitaire dans le cadre de cette thèse permettra de mieux appréhender les propriétés immunomodulatrices du choc septique à long terme, sa potentielle implication dans un phénomène d'immunosénescence accélérée et ainsi de mieux comprendre le syndrome post-sepsis et ses complications.

Parmi les autres atteintes majeures survenant au cours du sepsis, l'atteinte endothéliale est prépondérante. Loin d'être une simple barrière entre le sang et les tissus, il apparaît maintenant clairement que l'endothélium est un organe à part entière avec des fonctions qui lui sont propres et qui sont fortement perturbées au cours du sepsis.

III Dysfonctions endothéliales au cours du sepsis et conséquences à long terme

III.A Généralités

L'endothélium est constitué d'une fine monocouche cellulaire qui tapisse la face interne de tous les vaisseaux de l'organisme soit à la fois les vaisseaux sanguins (artères, veines, capillaires) mais aussi le système lymphatique. L'ensemble de l'endothélium d'un individu représente un poids d'environ 1,5 kg et une surface de 4 000 à 7 000 m², équivalente à environ 6 stades de football (Augustin et al., 1994). Le rôle de la paroi endothéliale est le maintien de l'homéostasie des organes en régulant diverses fonctions, notamment le trafic de fluides, de solutés, d'hormones et de macromolécules (Mehta & Malik, 2006). Les phénotypes des cellules endothéliales sont spécifiques des organes et du lit microvasculaire. Les propriétés endothéliales dépendent dans une certaine mesure du microenvironnement voisin, notamment des interactions avec les cellules spécialisées adjacentes (péryctes, podocytes, cellules épithéliales) et de la dynamique du flux sanguin (Aird, 2007). A titre d'exemple, les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique forment un environnement restrictif au passage des éléments sanguins vers le tissu cérébral, alors que celles des capillaires glomérulaires au niveau rénal sont fenêtrées afin de permettre la filtration sanguine. Il existe ainsi des librairies moléculaires des endothéliums organe-spécifiques qui montrent l'existence sur ces cellules endothéliales de clusters de facteurs de transcription, de facteurs angiogéniques, de molécules d'adhésion et de chimiokines caractéristiques de chaque organe (Nolan et al., 2013).

A l'état basal, l'endothélium assure un rôle de barrière semi-perméable entre les compartiments intra- et extravasculaires, en contribuant à maintenir un équilibre entre les cellules sanguines circulantes et un grand nombre de molécules dans le compartiment intravasculaire, tout en autorisant la perméabilité nécessaire à la régulation de la balance hydro-électrolytique entre les deux compartiments (Rodrigues & Granger, 2015). Ainsi, dans des conditions homéostatiques, l'endothélium maintient un tonus vasomoteur, limite l'adhésion et la pénétration leucocytaire, limite l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, régule la coagulation et la fibrinolyse de manière à prévenir les thromboses microvasculaires et maintenir une rhéologie sanguine optimale (Galley & Webster, 2004).

Concernant le tonus vasomoteur, la réponse des cellules endothéliales est indissociable de celle des cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes en raison d'une communication intercellulaire permanente et extrêmement élaborée entre ces deux types cellulaires. Trois principaux mécanismes régulent ce tonus, la formation de NO, la formation de prostacycline (PGI2) et l'induction de l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH) en réponse à divers stimuli (Figure 13) (Galley & Webster, 2004; Oak et al., 2018).

La PGI2 est produite à partir de l'acide arachidonique (AA) par la voie de la cyclo-oxygénase (COX). Elle diffuse vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes où elle active l'adenylyl cyclase (AC) produisant de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate). Le NO est produit à partir de la L-arginine (L-Arg) par la NO synthase endothéliale (eNOS) *via* l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) et la voie calcium/calmoduline (Ca^{2+}/CaM) et en réponse aux forces de cisaillement activant la voie Src/PI3-kinase/Akt, et divers agonistes (Ach, BK, ADP..). Le NO induit ainsi la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires *via* l'activation de la guanylyl cyclase soluble (GCs). Enfin, l'EDH implique en général une activation des canaux potassiques dépendants du calcium de conductance faible et moyenne (SKCaet IKCa, respectivement) induisant une hyperpolarisation de l'endothélium. Cette hyperpolarisation est par la suite transmise en partie *via* les jonctions gap myo-endothéliales aux cellules musculaires lisses sous-jacentes qui vont ainsi se relâcher.

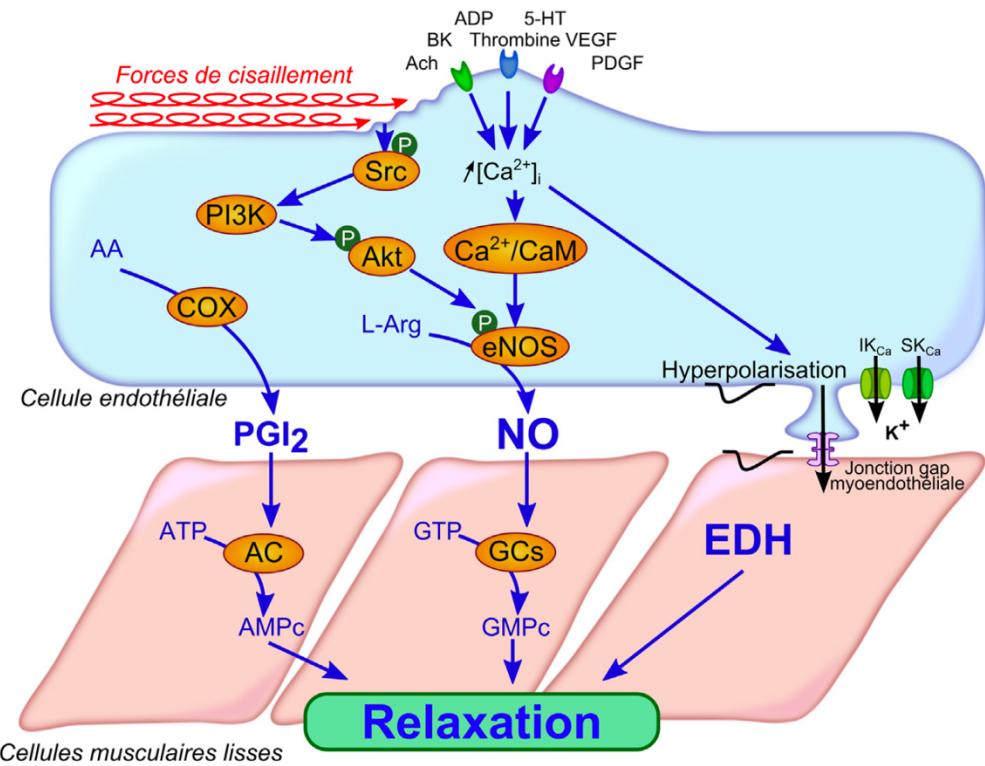


Figure 13 : Mécanismes vasorelaxants dépendants de l'endothélium.

(5-HT : sérotonine ; AA : acide arachidonique ; Ach : acétylcholine ; AC : adénylylcyclase ; ADP : adénosine diphosphosphate ; AMPc : adénosine 3,5 monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; BK : bradykinine ; CaM : calmoduline ; GCs : guanylyl cyclase soluble ; GMPc : guanosine 3,5 monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; K⁺ : potassium ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; Src : kinase de la famille Src ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). **Issu de Oak et al., 2018.**

La réponse endothéliale à l'infection repose en partie sur son rôle de « barrière » à l'interface entre le sang circulant et les tissus environnants. Les cellules endothéliales peuvent être directement confrontées aux agressions physiques (hypoxie, cisaillement...) ou chimiques (composés bactériens) lors d'un sepsis. La réponse des cellules endothéliales à ces stimuli peut être contenue et adaptée, on parle dans ce cas de « l'activation endothéliale », mais parfois lorsque les capacités d'adaptation endothéliales sont dépassées, une évolution vers la « dysfonction endothéliale » est possible (Boisrame-Helms et al., 2013).

III.B Glycocalyx

La barrière endothéliale est constituée de jonctions inter-endothéliales et de divers composants non cellulaires, tels que le glycocalyx et la matrice extracellulaire (Weinbaum et al., 2007). Le glycocalyx (ou glycolemmme) est une fine couche fragile de 0,2 à 0,5 µm d'épaisseur tapissant la face lumineuse des cellules endothéliales (Figure 14) (Gouverneur et al., 2006; Ince et al., 2016). Il est chargé négativement et constitué de macromolécules comme les protéoglycans et les sialoprotéines (van den Berg et al., 2003), dont la composition exacte est spécifique de l'organe et du lit vasculaire (Schmidt et al., 2012). Le glycocalyx en condition d'homéostasie permet ainsi de limiter le contact direct entre les cellules circulantes et l'endothélium (Iba & Levy, 2019).

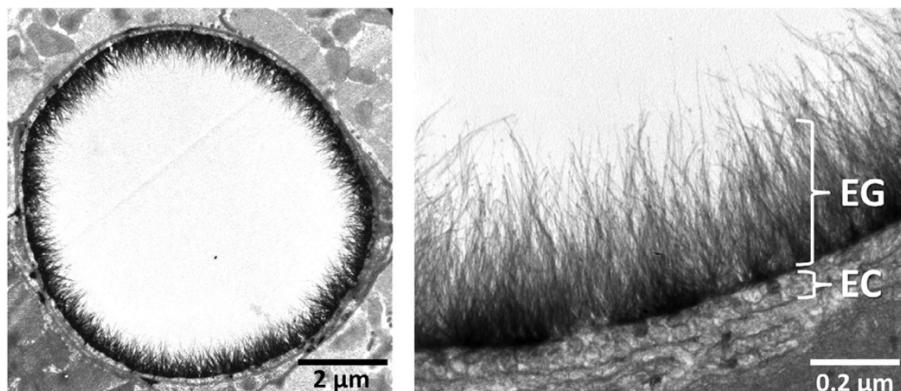


Figure 14 : Micrographie électronique d'un capillaire coronaire.
(EG: endothelial glycocalyx, EC: endothelial cell). Issu de Gouverneur et al., 2006.

Au cours d'une réaction inflammatoire comme lors du sepsis, la raréfaction du glycocalyx entraîne une mise à nu de l'endothélium favorisant la fuite capillaire (Figure 15) (Gaudette et al., 2020; Rehm et al., 2004). Cette atteinte du glycocalyx favorise aussi l'adhésion leucocytaire (Constantinescu et al., 2003). Après une lésion aiguë comme lors du sepsis, il faut environ 5 à 7 jours pour que la couche de glycocalyx se reconstitue, mais il faut encore plus de temps pour que l'activité hydrodynamique se rétablisse complètement (Potter et al., 2009). Ce délai explique en partie pourquoi le flux sanguin au niveau de la microcirculation reste longtemps altéré chez les patients en choc septique malgré la réanimation et l'optimisation de l'hémodynamique au niveau de la macrocirculation (Sakr et al., 2004; Verdant et al., 2009).

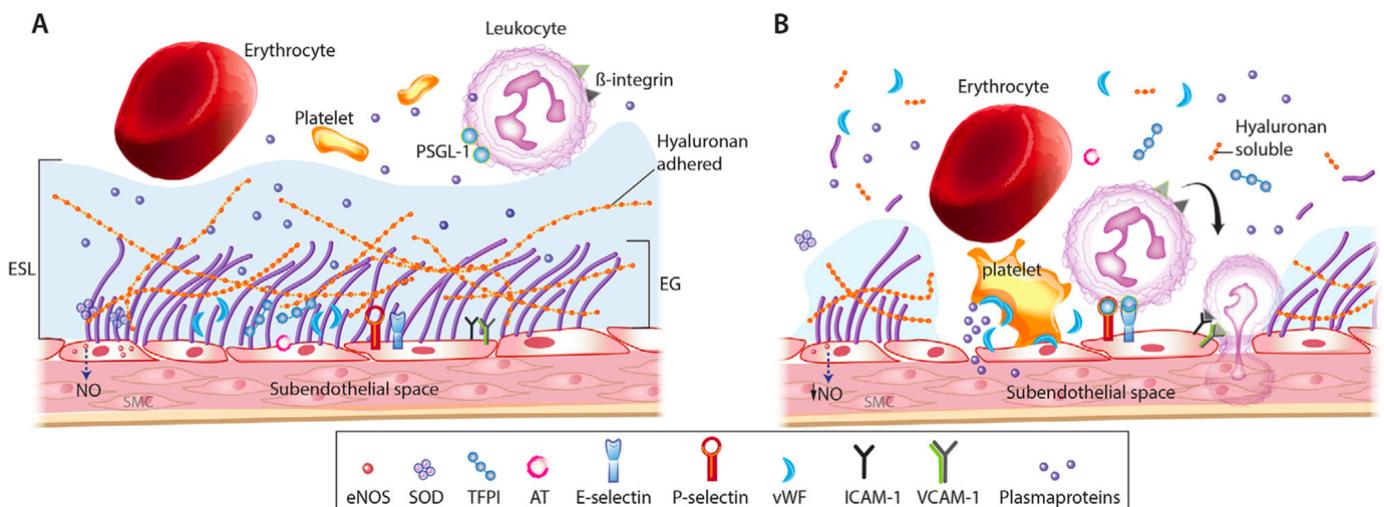


Figure 15 : Glycocalyx endothérial en condition physiologique et lors d'un sepsis.

A. Glycocalyx en condition physiologique. B. Atteinte du glycocalyx lors d'une agression aiguë. Avec la réduction de la couche superficielle endothéiale, les plaquettes et les leucocytes peuvent interagir avec les molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales. (AT: antithrombin ; EG: endothelial glycocalyx ; ESL: endothelial surface layer ; ECSOD: endothelial cell superoxide dismutase ; eNOS: endothelial nitric oxide synthase ; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1 ; PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1 ; TFPI: tissue factor pathway inhibitor ; VWF: von Willebrand factor ; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1). **Issu de Gaudette et al., 2018.**

III.C Activation endothéiale au cours du sepsis

Au cours du sepsis, l'activation endothéiale peut résulter de trois principaux facteurs qui sont les PAMPs ou les DAMPs qui activent la cellule endothéiale *via* les PRRs endothéliaux, les cytokines pro-inflammatoires et enfin les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS).

Comme les leucocytes, les cellules endothéliales expriment des PRRs et notamment des TLR des RLR et des NLR. Les 10 TLR connus à ce jour chez l'homme sont exprimés par les cellules endothéliales mais avec des degrés d'expressions qui varient selon la localisation (Table 2) (Khakpour et al., 2015; Salvador et al., 2016). Ceci explique en partie pourquoi, bien que l'endothélium ayant une distribution ubiquitaire, les atteintes peuvent être variables selon les organes lors du sepsis.

Human TLR	ENDOTHELIAL CELL TYPES														
	Umbilical vein [12,14,17]	Pulmonary artery	Aortic [14,16]	Subclavian artery	Carotid artery [16]	Mesenteric artery [16]	Iliac artery [16]	Temporal artery [16]	Coronary Artery [12]	Lymphatic [15]	Thymus [15]	Microvascular [12,17,18]	Dermal [17,19]	Cerebral [20]	Endothelial Progenitor Cells* [21,22]
TLR 1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TLR 2	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TLR 3	+		+						+	+	+	+	+	+	+
TLR 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TLR 5	+		+/						+	+	-	+	+	+	+
TLR 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TLR 7	+	+/	-	-	-	+	-	+			+		+	-	
TLR 8	-	+/									-	-	+	+	
TLR 9	+	+/	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
TLR 10	+	+/							+		+		+	+	

Tableau 2 : Expression des TLRs selon la localisation.

+ : exprimé de base ; - : non exprimé de base ; ↑ : augmenté ; ↓ : diminué ; → : inchangé ; D : expression de novo après stimulation par des agonistes inflammatoires. **Issu de Salvador et al., 2016.**

Les cytokines constituent une vaste catégorie de protéines relativement petites (< 40 kDa) (interleukines, chimiokines, interférons, TNF et growth factors) produites et libérées principalement par les cellules immunitaires (Dinarello, 2007). Parmi ces cytokines, les cytokines pro-inflammatoires libérées lors d'un SIRS sont également capables d'activer directement les cellules endothéliales, notamment le TNF (Liang et al., 2014) et l'IL-6 (Watson et al., 1996). Enfin, les ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl) et les RNS (NO^{\bullet} , $ONOO^{\bullet-}$), de puissants agents antimicrobiens (Li et al., 2020) produits par les cellules immunitaires telles que les macrophages et les polynucléaires neutrophiles exercent également un rôle majeur dans l'activation de l'endothélium vasculaire (Huet et al., 2011) (Figure 16).

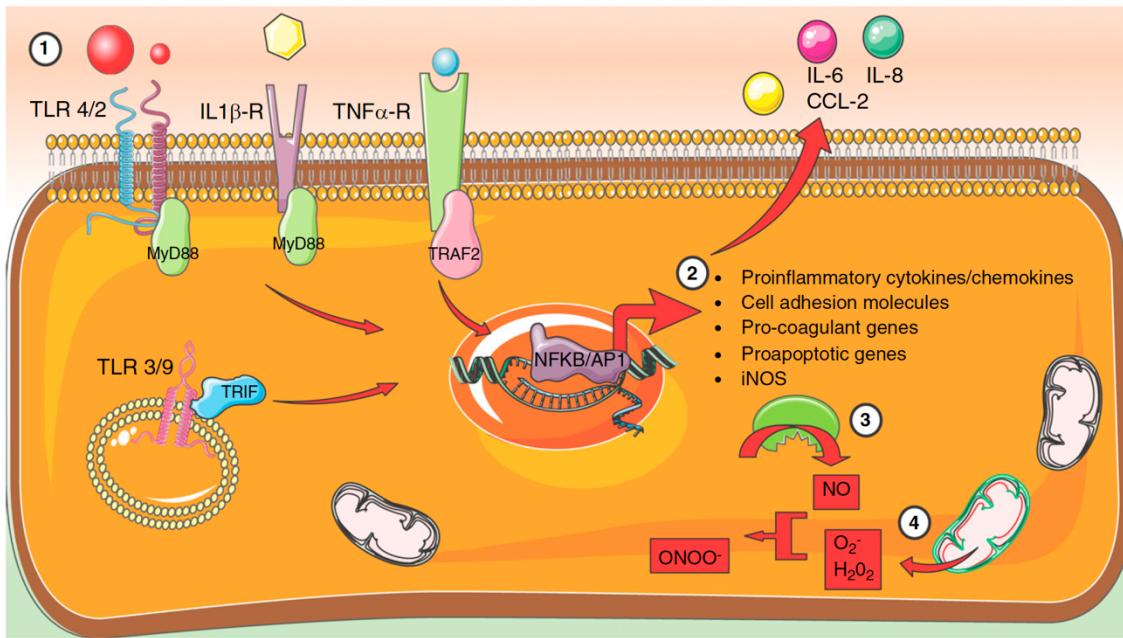


Figure 16 : Activation de la cellule endothéiale.

Une fois un ou des PRR(s) activés par des PAMPs et/ou des DAMPs (1), des voies intracellulaires sont déclenchées (impliquant notamment MyD88, TRIF et TRAF2) conduisant à l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription (principalement NF- κ B, AP-1 et IRF3). Consécutivement, la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et de facteurs procoagulants augmente (2). En outre, l'activation des cellules endothéliales provoque une régulation à la hausse de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), ce qui entraîne une surproduction de NO (3), qui peut se complexer avec des espèces réactives de l'oxygène pour former du peroxynitrite (ONOO⁻) (4). (AP1 : protéine activatrice 1 ; CCL-2 : ligand 2 de la chimiokine (motif CC) ; MyD88 : réponse primaire à la différenciation myéloïde 88 ; NF- κ B : facteur nucléaire- κ B ; TLR : Toll-like receptor ; TNF- α -R : récepteur du facteur de nécrose tumorale- α ; TRAF2 : facteur 2 associé au récepteur du TNF ; TRIF : TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β). **Issu de Joffre et al., 2020.**

Une fois activée lors du sepsis, la réaction endothéliale va consister dans un premier temps en une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence, que ce soit au niveau de leur surface membranaire ou au niveau plasmatique. L'expression des molécules d'adhésion concerne particulièrement les sélectines, les intégrines et des membres de la superfamille des immunoglobulines connus sous le nom de molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) et de molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1). Cela permet le recrutement des leucocytes circulants (Figure 17) mais aussi de plaquettes, qui vont amplifier le phénomène en produisant des molécules pro-inflammatoires, procoagulantes (Ley et al., 2007).

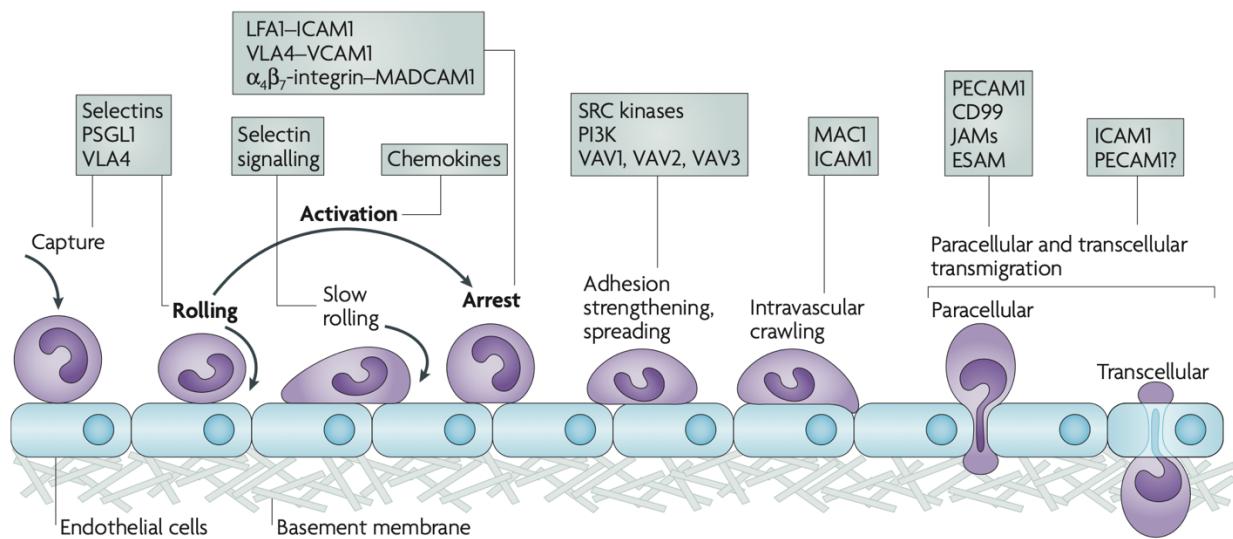


Figure 17 : Cascade d'adhésion des leucocytes.

Les trois étapes originales sont indiquées en gras : le roulement, qui est médié par les sélectines, l'activation, qui est médiée par les chimiokines, et l'arrêt, qui est médié par les intégrines. Les molécules clés impliquées dans chaque étape sont indiquées dans des encadrés. (ESAM: endothelial cell-selective adhesion molecule ; ICAM1: intercellular adhesion molecule 1 ; JAM: junctional adhesion molecule ; LFA1: lymphocyte function-associated antigen 1 (also known as α L β 2-integrin) ; MAC1: macrophage antigen 1 ; MADCAM1: mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1 ; PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand 1 ; PECAM1: platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1 ; PI3K: phosphoinositide 3-kinase ; VCAM1: vascular cell-adhesion molecule 1; VLA4: very late antigen 4 (also known as α 4 β 1-integrin)). **Issu de Ley et al., 2007.**

Dans un premier temps, les motifs glucidiques (tels les ligands Sialyl-Lewis) présents sur les leucocytes se fixent de manière lâche à la sélectine E et à la sélectine P, ce qui leur permet de rouler sur l'endothélium. Dans un deuxième temps, les leucocytes qui roulent sont activés par les chimiokines libérées localement par les macrophages et les cellules endothéliales pour exprimer les intégrines à leur surface, ce qui permet une adhésion plus ferme à ICAM-1 et à VCAM-1 et initie leur migration trans-endothéliale, ou diapédèse, dans les tissus lésés (Zhong et al., 2018). A noter, ICAM-1 n'est exprimé sur les cellules endothéliales qu'à la suite de leur activation alors qu'ICAM-2 est constitutivement présente à leur surface. Les chimiokines qui sont liées à l'endothélium par l'intermédiaire des sulfates d'héparane forment un gradient chimiotactique qui oriente la migration des leucocytes (Kolaczkowska & Kubis, 2013). En outre, le gradient de chimiokines (telles que CXCL8, CXCL1, CXCL2 et CXCL5) produites par les

cellules immunitaires et les cellules endothéliales favorise le recrutement des neutrophiles à partir des réserves de la moelle osseuse et améliore l'adhésion de ces neutrophiles. La sélectine P présente sur les cellules endothéliales ne se contente pas de capturer les leucocytes et de favoriser leur roulement (« *rolling* »), elle active également les intégrines par le biais du ligand-1 de la glycoprotéine de la sélectine P (PSGL-1) et induit une nouvelle activation des leucocytes (Mestas & Ley, 2008). D'autres molécules qui se sont avérées nécessaires à la transmigration des leucocytes à travers la paroi endothéliale sont PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) et CD99 (Muller & Randolph, 1999; Schenkel et al., 2002).

III.D Dysfonction endothéliale au cours du sepsis

Au niveau vasculaire, le sepsis cause un dérèglement des interactions et des réseaux de communication cellule-cellule qui maintiennent habituellement l'homéostasie dans des conditions normales. Au cours du sepsis, la dysfonction endothéliale joue un rôle majeur dans l'atteinte hémodynamique et la survenue de défaillances multi-viscérales à travers quatre mécanismes principaux : la migration leucocytaire aboutissant à une inflammation localisée excessive, la fuite capillaire, la dérégulation des mécanismes vasomoteurs, et la participation à la coagulopathie (Boisrame-Helms et al., 2013).

III.D.1 *Infiltration leucocytaire et stress oxygéné et nitrogéné*

Une fois recrutés, les leucocytes produisent d'importantes quantités de ROS, de RNS, de protéases et d'enzymes cytotoxiques. Cette libération excessive de ROS et de RNS dépasse les défenses antioxydantes des cellules endothéliales, aboutissant à des lésions cellulaires sévères, non seulement par atteinte directe de la membrane plasmique mais également par déclenchement de l'apoptose (Prauchner, 2017). Les ROS peuvent également pénétrer à l'intérieur de la cellule comme H_2O_2 via les aquaporines et $O_2^{*^-}$ à travers les canaux chlorure CIC-3 (Fisher, 2009). Une fois à l'intérieur, ils peuvent ainsi causer des lésions aux organites comme les mitochondries et induire des modifications chimiques des molécules et protéines

produites par la cellule endothéliale tel l'ARNm. Les dommages cellulaires sont à l'origine d'un cercle vicieux inflammatoire qui touche non seulement l'endothélium mais également les tissus environnents, comme les cellules musculaires lisses sous-jacentes.

Enfin, la fuite vasculaire a longtemps été considérée comme une conséquence nécessaire du recrutement des leucocytes du sang vers le tissu et que la modulation de cette fuite liquidienne risquait également de modifier la réponse immunitaire locale. Cependant, des études expérimentales récentes semblent indiquer que le trafic des leucocytes et la perméabilité vasculaire sont en fait régulés par des voies distinctes (Filewod & Lee, 2019), suggérant une modulation possible de la fuite capillaire sans pour autant altérer le recrutement des leucocytes et la clairance des pathogènes.

III.D.2 Perméabilité endothéliale dans le sepsis

Outre le glycocalyx, dont l'atteinte participe aussi à la fuite capillaire, la perméabilité intercellulaire endothéliale est régulée par des jonctions d'adhérences (cadhérine-cadhérine) et des jonctions serrées (claudine/occludine). Les cadhérines endothéliales vasculaires (ou VE-cadhérine) forment le principal composant des jonctions d'adhérences dont le rôle est de réguler l'adhésion des cellules endothéliales mais aussi d'empêcher la fuite vasculaire et/ou la migration des leucocytes à l'état physiologique. Au cours du sepsis, les médiateurs inflammatoires suppriment la signalisation AMPc/Rac1, favorisent l'activité de Rho et activent des kinases telles que Src et Pyk2 (Allingham et al., 2007), ce qui entraîne la phosphorylation du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine, sa dissociation de la caténine p120 et induit son endocytose par internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine (Radeva & Waschke, 2018). La diminution de VE-cadhérine de surface favorise ainsi la perméabilité intercellulaire. De la même manière, les jonctions serrées sont aussi touchées dans le sepsis, avec une réduction des niveaux de protéines de type l'occludine et zonula occludens-1 (He et al., 2018; Ni et al., 2019). A titre d'exemple, le TNF- α , provoque une dislocation de la claudine-5 au niveau des jonctions cellule-cellule endothéliales par l'activation de la voie NF- κ B (Clark et al., 2015). Les *gap-jonctions*, formées par les connexines, qui permettent le flux intercellulaire de petites molécules et de solutés semblent aussi touchées dans le sepsis, contribuant à une diminution de perméabilité endothéliale (Parthasarathi, 2012). L'hyperperméabilité endothéliale lors du choc septique entraîne une hypovolémie absolue et un œdème interstitiel, qui augmente conséutivement

la pression interstitielle et aggrave l'hypoperfusion tissulaire. Plusieurs autres mécanismes impliqués dans le maintien de la barrière endothéliale ont été suggérés. Parmi ces derniers, le déséquilibre Angiopoïétine-1/Angiopoïétine-2 (Figure 18) (Kim et al., 2016). Ang-1 est produit de manière constitutive, en particulier par les péricytes et les cellules musculaires lisses, tandis qu'Ang-2 est produit par les cellules endothéliales où il est stocké dans les corps de Weibel-Palade pour être libéré rapidement lors de l'exposition à des stimuli inflammatoires. L'angiopoïétine-1 (Ang1) et l'angiopoïétine-2 (Ang2) ainsi que leurs récepteurs tyrosine kinase, Tie1 et Tie2, jouent des rôles majeurs dans l'homéostasie vasculaire par le biais de plusieurs voies de signalisation, dont Akt et FOXO1. Ang1 agit comme un agoniste, en phosphorylant Tie2 et par l'activation d'Akt en inhibant Foxo1, ce qui inhibe la fuite vasculaire. De plus, Ang1 produit par les cellules périvasculaires empêche la perméabilité vasculaire pendant l'endotoxémie en inhibant l'internalisation de la VE-cadhérine. Ang2, en revanche, agit comme un antagoniste de Tie2 en bloquant l'action stabilisatrice de l'Ang1. L'exposition à l'Ang2 entraîne la formation d'un complexe entre Tie2, l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et la kinase d'adhésion focale, ce qui conduit à l'internalisation de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et finalement à la déstabilisation de la barrière endothéliale. Ang2 semble aussi induire la phosphorylation de la VE-cadhérine, entraînant une perturbation des jonctions d'adhérence. Au cours du sepsis, l'expression de l'Ang2 par les cellules endothéliales entraîne une rupture de l'équilibre Ang1-Ang2 et augmente la perméabilité vasculaire (Leligdowicz et al., 2018). Une étude ancillaire de l'essai ProCESS démontre d'ailleurs des niveaux significativement plus élevés d'Ang-2 sérique chez les patients ne survivant pas au choc septique (Hou et al., 2017).

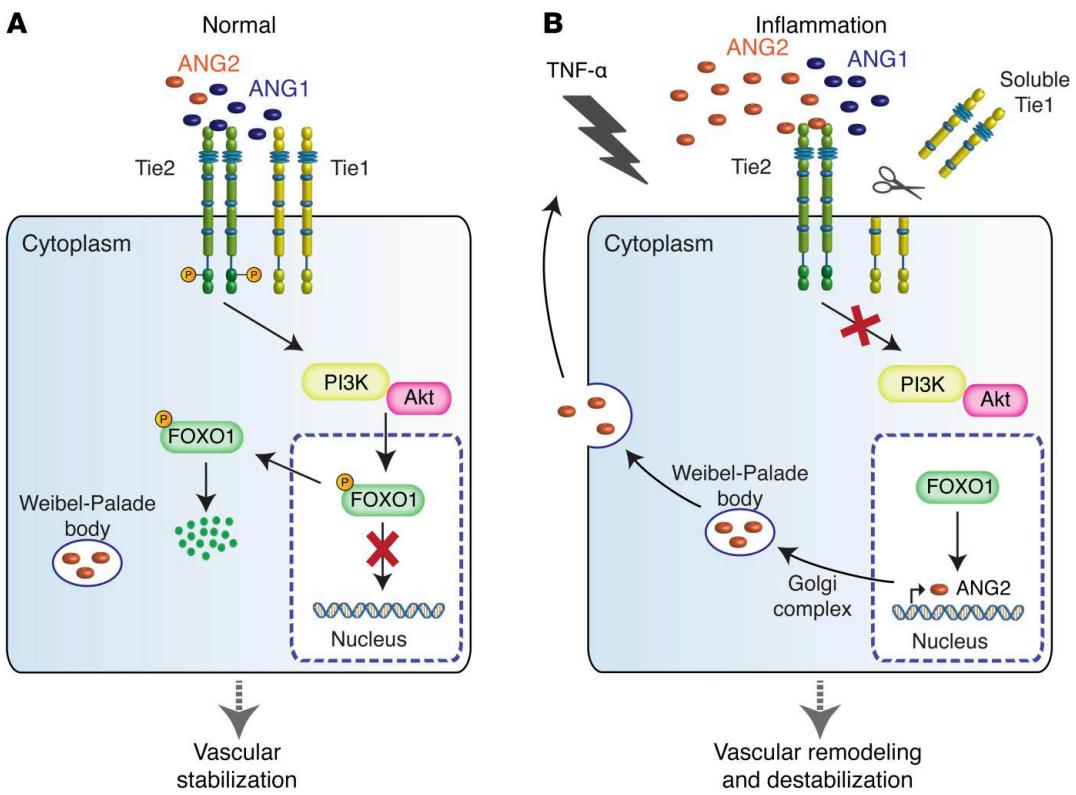


Figure 18 : Boucle de régulation reliant Ang1, Ang2, Tie1 et Tie2 dans les cellules endothéliales.

(A) Dans des conditions normales, l'action agoniste d'Ang1 surpassé celle d'Ang2 dans l'activation de la signalisation Tie2 d'une manière Tie1-dépendante, conduisant à l'activation de la voie PI3K/Akt. La phosphorylation de FOXO1 qui en résulte favorise son exclusion nucléaire, son ubiquitination puis sa dégradation. Ceci conduit donc à un arrêt de son activité transcriptionnelle, ce qui augmente l'expression des gènes qui favorisent la stabilisation vasculaire. (B) *A contrario*, après une infection, le TNF- α est libéré, Tie1 est réduit par l'élimination de l'ectodomaine et la phosphorylation de Tie2 est supprimée par l'Ang2 sécrété par les corps de Weibel-Palade. L'inactivation de la voie PI3K/Akt favorise l'activité transcriptionnelle de FOXO1 et augmente l'expression d'Ang2 et d'autres gènes de déstabilisation vasculaire. La balance est déséquilibrée en faveur d'Ang2 établissant une boucle de rétroaction positive. **Issu de Kim et al., 2016.**

III.D.3 Dérèglement vaso-moteur dans le sepsis

Au cours du sepsis le tonus vasculaire est altéré, en partie par une perturbation de la production de NO. Il existe trois isoformes de nitric oxydase synthase (NOS) : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et une NOS inducible (iNOS). Toutes les NOS catalysent la production de NO à partir des substrats L-arginine. La nNOS et la eNOS sont toutes deux

exprimées de manière constitutive. Classiquement, la eNOS est considérée comme la principale isoforme impliquée dans le contrôle de la fonction vasculaire (Besnier E, 2015). Plus récemment, des études ont montré que la nNOS est aussi présente dans l'endothélium vasculaire et contribue de manière importante au maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire (Costa et al., 2016). Au cours du sepsis, le taux de NO est augmenté (jusque mille fois) en partie *via* l'activation de l'iNOS, notamment dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Ceci est responsable en partie de la vasodilatation observée au cours des états de choc. L'endotoxine et les cytokines pro-inflammatoires (tel l'IFN- γ) augmentent l'expression de la iNOS (Spink et al., 1995). Les voies de l'iNOS semblent aussi avoir un effet indirect sur l'hypotension artérielle lors du sepsis en diminuant la sensibilité aux catécholamines (Barth et al., 2006). De la même façon, selon des travaux récents la nNOS joue aussi un rôle comme facteur de résistance aux vasopresseurs (Nardi et al., 2014). Un autre mécanisme suggéré repose sur la métabolisation de la L-arginine par les NOS qui ne serait que partielle lors du sepsis du fait d'un dysfonctionnement du site oxygénase, soit du fait des conditions d'hypoxies locales, soit par un déficit en cofacteur BH4, orientant alors la production vers la formation d'ion superoxyde (O_2^-). En se combinant avec le NO déjà synthétisé, l'ion superoxyde pourrait aboutir à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) présentant une toxicité vasculaire avec hypotension artérielle (Figure 19). L' $ONOO^-$ aurait de plus la capacité d'inactiver les catécholamines par oxydation au niveau de leur cycle aromatique ou bien d'induire une inactivation des récepteurs α et β adrénergiques, ainsi que des récepteurs de la dopamine ou de la vasopressine (Benkusky et al., 1999; Lewis et al., 2007).

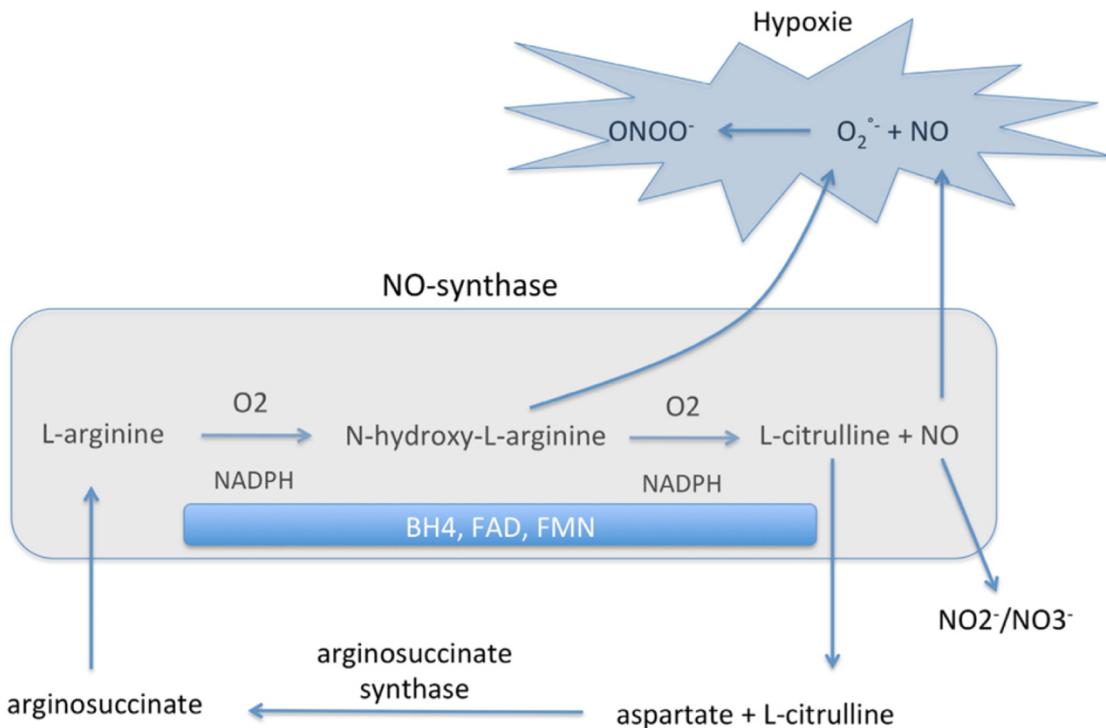


Figure 19 : Représentation schématique du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et de ses principaux dérivés.

La L-citrulline et le NO sont produits à partir d'un précurseur qu'est la L-arginine *via* la NO-synthase et ses co-facteurs : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), tétrabioptérine (BH4), flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN). Dans certaines conditions, la L-citrulline peut être recyclée en L-arginine *via* l'arginosuccinate synthase. Les nitrates (NO₃⁻) et nitrites (NO₂⁻) sont des métabolites actifs du NO. **Issu de Besnier et al., 2015.**

Parmi les autres mécanismes impliqués dans cette vasopлегie induite par le sepsis sous l'influence directe de l'endothélium, des travaux ont de longue date évalué les effets vasodilatateurs de la prostacycline produite par la cyclooxygénase 2 (COX2) (Zardi et al., 2007), mais aussi de l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants induisant l'EDH (Subramani et al., 2010).

Ces mécanismes expliquent en partie la vasopлегie responsable de l'hypovolémie relative dans le sepsis. Cependant, d'autres mécanismes sont aussi impliqués dans ces phénomènes de vasopлегie à l'origine d'un choc distributif comme c'est le cas des états de choc septique. Il s'agit notamment de l'atteinte des cellules musculaires lisses vasculaires, de la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G touchant les adrénorécepteurs, les récepteurs de la vasopressine 1, les récepteurs de l'angiotensine de type 1 mais aussi de l'insuffisance surrénale liée à un état critique décrit par l'anglicisme « *critical illness-related corticosteroid insufficiency* » (CIRCI) (Levy et al., 2018).

III.D.4 L'endothélium et la cascade de coagulation dans le sepsis

La dysfonction endothéliale joue un rôle important dans la perturbation de l'équilibre hémostatique dans le sepsis. En effet, l'endothélium est impliqué dans les trois principales voies pathogéniques associées à la coagulopathie dans le sepsis : la génération de thrombine médiée par le facteur tissulaire, le dysfonctionnement de l'anticoagulation et l'altération de la fibrinolyse.

Le facteur tissulaire (ou TF pour *tissular factor*) est le principal initiateur de l'activation de la coagulation dans le sepsis. Les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TF dans les cas de sepsis, mais les cellules endothéliales y contribuent également dans une large mesure (Figure 20) (Levi & van der Poll, 2013b). Une fois activées par des produits bactériens ou par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 β , les cellules endothéliales expriment le TF à leur surface. Cette expression de TF *in vivo* étant limitée à certains organes (Aird, 2003). Le TF se lie au facteur de coagulation VII pour aboutir par l'intermédiaire du facteur X à la production de thrombine et de fibrine. Le rôle central du TF dans la coagulation induite par le sepsis est bien établi grâce à des études cliniques chez l'homme et des modèles primates dans lesquels des stratégies empêchant l'activation de la voie TF-facteur VIIa abrogeaient l'activation de la voie commune de la coagulation provoquée par l'administration de LPS ou de bactéries (Levi & van der Poll, 2010). En outre, dans des modèles létaux de sepsis chez les babouins, l'inhibition du facteur VIIa prévient la survenue de défaillance d'organes ainsi que la mortalité (Carr et al., 1994; Creasey et al., 1993). Enfin, chez des souris génétiquement modifiées, présentant une absence quasi totale de TF, il existait une réduction de l'activation de la coagulation, de l'inflammation et de la mortalité induites par l'injection de LPS à forte dose par rapport aux souris témoins (Pawlinski et al., 2004). Sous sa conformation associée aux cellules, le TF peut se trouver dans les microparticules (MP) libérées par les cellules hématopoïétiques et endothéliales. Ces MP ont été impliquées dans l'activation de la coagulation et de l'inflammation dans le sepsis (Meziani et al., 2010). Lors d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, les cellules endothéliales sont capables de libérer un TF épissé alternativement (sans exon 5) qui circule sous une forme soluble pouvant exercer une activité procoagulante (Szotowski et al., 2006).

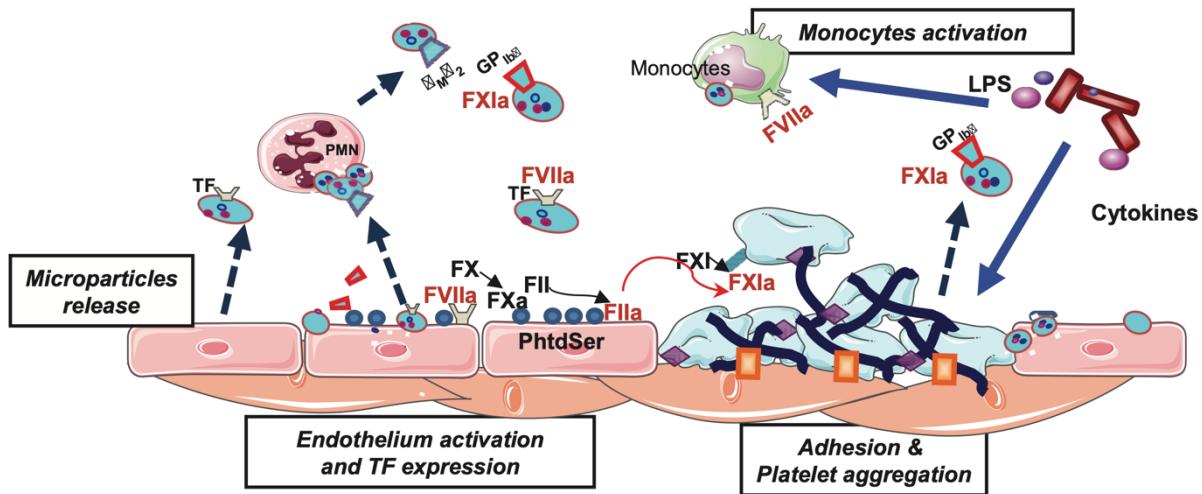


Figure 20 : Expression du facteur tissulaire et initiation de la cascade de la coagulation.

Le facteur tissulaire (TF) exprimé par les cellules endothéliales activées, les plaquettes et les monocytes ainsi que par les structures sous-endothéliales exposées par les lésions endothéliales, se lient au facteur VII (FVII) et l'activent. Ce complexe TF-FVIIa active secondairement les facteurs X (FX) puis le facteur II (FII). Le facteur IIa constituant la thrombine transforme le fibrinogène en un caillot de fibrines. **Issu de Meziani et al. 2010.**

La coagulation est régulée par trois principaux mécanismes anticoagulants : l'antithrombine, le système de la protéine C et l'inhibiteur de la voie du TF (TFPI pour tissue factor pathway inhibitor). Le sepsis est à l'origine d'une altération du fonctionnement de ces trois voies, principalement en raison d'un dysfonctionnement endothérial (Levi & van der Poll, 2013b). Les cellules endothéliales au repos génèrent de la protéine C activée (APC, pour activated protein C) à leur surface et produisent de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) pour stimuler la fibrinolyse et empêcher la formation de thrombine et l'adhésion des plaquettes. L'antithrombine est le principal inhibiteur de la thrombine et du facteur X activé (Xa). Dans des conditions physiologiques, les glycosaminoglycans présents sur la paroi des vaisseaux soutiennent l'inhibition de la thrombine et des autres enzymes de la coagulation par l'antithrombine. Au cours du sepsis, les concentrations d'antithrombine sont fortement réduites en raison d'une production altérée, d'une dégradation accrue et d'une consommation causée par la production soutenue de thrombine (Levi & van der Poll, 2010).

La fonction antithrombine est en outre compromise par la diminution de la production de glycosaminoglycans à la surface de l'endothélium, médiée par les cytokines pro-

inflammatoires (Schouten et al., 2008). Le TFPI est le principal inhibiteur du complexe TF-facteur VIIa. Il s'agit d'un inhibiteur plasmatique synthétisé notamment par les cellules endothéliales (Monroe & Key, 2007). Le TFPI se lie avec une grande affinité à la fois au complexe TF-facteur VIIa et au facteur Xa présents dans le plasma et sur les cellules endothéliales. Dans des conditions normales, le TFPI est fixé à l'endothélium par des protéoglycans, ce qui facilite ses propriétés d'inhibition du facteur VIIa et du facteur X à la surface de l'endothélium (Ott et al., 2000). La fonction du TFPI est limitée dans le sepsis par la synthèse réduite des glycosaminoglycans sur les surfaces endothéliales. A noter, l'administration de TFPI recombinant inhibe de manière proportionnée la génération de thrombine induite par le LPS chez l'homme (de Jonge et al., 2000). Des doses pharmacologiques de TFPI peuvent prévenir la mortalité au cours d'une infection ou d'une inflammation systémique, ce qui indique que des concentrations élevées de TFPI sont capables de moduler la coagulation médiée par le TF (Carr et al., 1994; Creasey et al., 1993).

L'endothélium vasculaire joue par ailleurs un rôle important dans le système de la protéine C, qui représente un mécanisme anticoagulant endogène crucial en vertu de la capacité de l'APC à inactiver par protéolyse les cofacteurs de la coagulation Va et VIIa. L'APC est formée à partir de la protéine C lorsque la thrombine se lie au récepteur de la thrombomoduline présent sur les cellules endothéliales. L'activation de la protéine C en APC par la thrombine liée à la thrombomoduline est augmentée par la présence du récepteur endothérial de la protéine C (EPCR, pour *endothelial protein C receptor*). Au cours du sepsis, le système de la protéine C est altéré en raison de plusieurs facteurs, notamment une diminution de la synthèse et une consommation de la protéine C, ainsi qu'une diminution de l'activation de la protéine C due à une expression réduite de la thrombomoduline et de l'EPCR sur les cellules endothéliales (Levi & van der Poll, 2010). Les effets anticoagulants de l'APC dans l'hémostase peuvent être renforcés par sa capacité à inhiber la fibrinolyse en supprimant la fonction de deux inhibiteurs de la fibrinolyse : l'inhibiteur fibrinolytique activable par la thrombine (TAFI) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) (Danese et al., 2010).

III.D.4.a Activation de la coagulation et coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

La coagulation intravasculaire disséminée est l'une des complications les plus graves du sepsis, associée à une mortalité extrêmement élevée (Iba et al., 2019). L'un des mécanismes suggérés est la perturbation de la membrane de la cellule endothéiale par le complexe d'attaque membranaire (Kerr & Richards, 2012), qui majore l'inflammation et active la voie microthrombotique. L'activation de la voie micro-thrombotique sert de médiateur à l'activation plaquettaire et à l'exocytose de multimères de facteur de von Willebrand (VWF) de taille inhabituellement grande à partir des cellules endothéliales et initie la microthrombogenèse (Kerr & Richards, 2012).

L'adhésion des cellules à l'endothélium lésé repose sur des protéines adhésives, telle que le VWF. Physiologiquement, le VWF agit pour stabiliser l'adhésion des plaquettes aux sites de lésions vasculaires. Les monomères du VWF peuvent être liés par des liaisons disulfures pour former des multimères ultra-larges (Moake, 2002). L'assemblage de ces multimères du VWF a lieu dans les cellules endothéliales, où ils sont stockés dans les corps de Weibel-Palade ainsi que dans les granules α des plaquettes. Ils sont libérés lors du sepsis et peuvent se lier à la glycoprotéine Iba des plaquettes. Au cours de l'hémostase en condition normale, les multimères du VWF sont clivés par une protéase appelée ADAMTS13 (*disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) notamment dans des circonstances de fortes contraintes de cisaillement.

Cependant, au cours d'une inflammation massive lors d'un sepsis, des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'hémoglobine plasmatique libre, les fragments protéolytiques du VWF, la toxine de Shiga et des auto-anticorps neutralisants peuvent inactiver l'ADAMTS-13 (Figure 21) (Nolasco et al., 2005; Studt et al., 2005). L'ADAMTS-13 peut également être inhibée par la plasmine, la thrombine, les produits de la coagulation activée, l'élastase granulocytaire libérée par les neutrophiles activés ainsi que par les ROS dérivées des neutrophiles. L'ensemble de ces événements conduit à une déficience acquise en ADAMTS-13 et donc une augmentation des niveaux de multimères ultra-larges du VWF, qui facilitent l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé et donc la formation de microthrombi (Dolmatova et al., 2021).

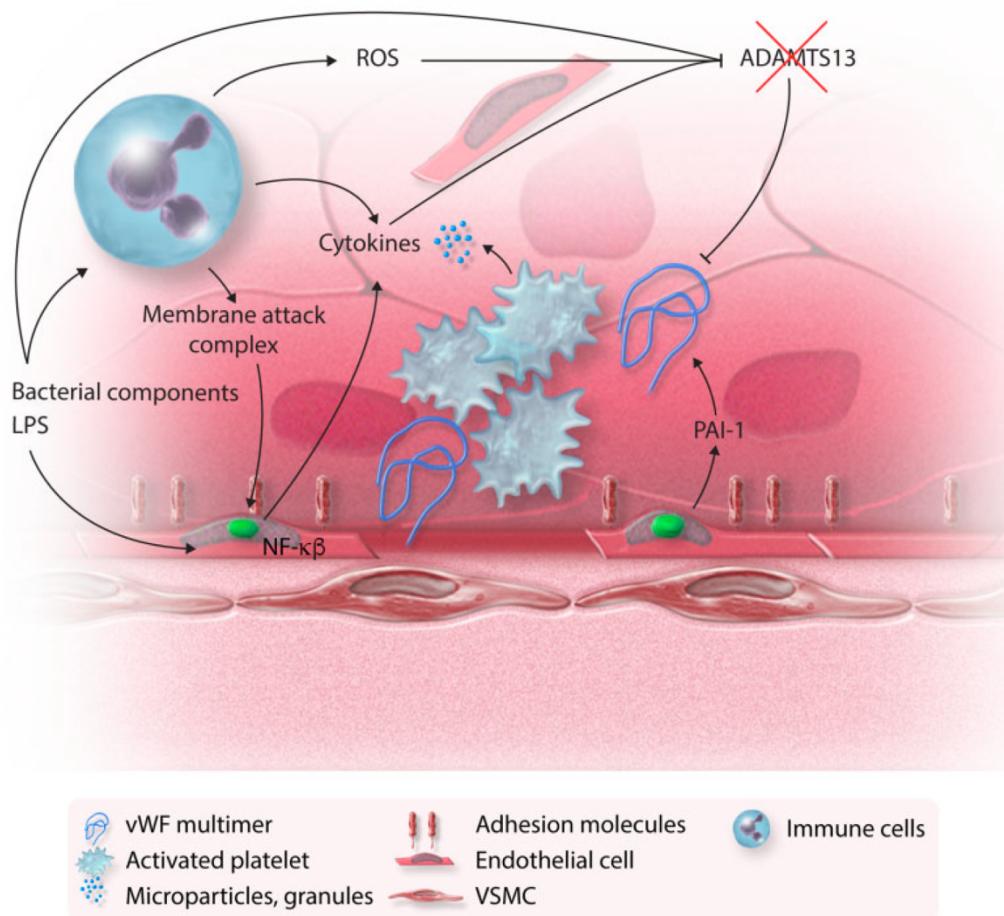


Figure 21 : Endothélium et cascade de coagulation dans le sepsis.

Lorsque l'intégrité endothéliale est compromise par des complexes d'attaque membranaire et l'apoptose endothéliale, un état prothrombotique s'ensuit : les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion et les plaquettes sont activées. Les composants bactériens, les ROS et les cytokines entraînent une déficience acquise en ADAMTS13 et une accumulation de multimères de VWF qui sont sécrétés par l'endothélium activé. L'endothélium activé sécrète également du PAI-1, contribuant ainsi à un état prothrombotique. **Issu de Dolmatova et al., 2021.**

Enfin, en cas de sepsis, l'endothélium libère des quantités accrues de PAI-1, supprimant ainsi la voie fibrinolytique. Tout cela crée un déséquilibre entre les voies prothrombotiques et antifibrinolytiques, ce qui conduit à la dissémination de thrombi microvasculaires riches en fibrine, comme on l'observe dans la CIVD (Levi & van der Poll, 2013a). Il en résulte une formation de thrombi microvasculaires à l'échelle de l'organisme, une consommation des facteurs de coagulation et des hémorragies, qui constituent la présentation la plus classique

de la CIVD. Alors que les cellules endothéliales orchestrent une grande partie de la cascade de coagulation et l'activation et l'agrégation des plaquettes, les plaquettes elles-mêmes peuvent sécréter un certain nombre de cytokines lors de leur activation (Thomas & Storey, 2015). La plupart de ces cytokines stimulent les cellules immunitaires et favorisent l'adhésion des cellules immunitaires à l'endothélium (Thomas & Storey, 2015), cependant quelques-unes d'entre elles, ont des effets très distincts sur l'endothélium lui-même. CD40L, par exemple, interagit avec CD40 sur les cellules endothéliales et favorise la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion (Henn et al., 1998). Les plaquettes activées libèrent également de l'IL-1 α et/ou β et induisent la sécrétion de CCL2 (une chimiokine) et l'expression de ICAM-1 par les cellules endothéliales (Gawaz et al., 2000).

III.E Complications cardio-vasculaires post-septiques

Comme évoqué au préalable, parmi les causes majeures de morbi-mortalité survenant après un sepsis, outre les nouvelles infections, la survenue de complications cardio-vasculaires post-septiques apparaissent en tant que nouveaux problèmes de santé publique (24).

III.E.1 *Complications cardio-vasculaires à la phase aiguë et à court terme*

En effet, l'implication du sepsis sur la survenue d'une complication cardio-vasculaire à type de syndrome coronarien aigu (SCA) ou d'ischémie cérébrale artérielle (transitoire ou constituée) à la phase aiguë de cette infection ou au décours immédiat est connue de longue date (Smeeth et al., 2004; Spodick et al., 1984; Syrjanen et al., 1988).

Ce risque accru de présenter une complication cardio-vasculaire est démontré aussi bien lors d'infection bactérienne que lors d'une infection virale. Ce risque est désormais démontré quel que soit le site infectieux (Figure 22). Enfin, plus la sévérité de l'infection est importante plus le risque cardio-vasculaire est augmenté (Corrales-Medina et al., 2015; Ramirez et al., 2008). A titre d'exemple, une étude a mis en évidence une augmentation considérable du risque d'infarctus du myocarde au cours des 15 premiers jours suivant une hospitalisation pour

pneumonie bactérienne aiguë (Corrales-Medina et al., 2009). Avec pour chaque patient un risque 48 fois supérieur à n'importe quelle période de 15 jours durant l'année précédente. Une étude plus récente encore a montré une augmentation majeure du risque d'être hospitalisé pour infarctus du myocarde durant les 7 jours suivant une infection virale confirmée en laboratoire, par rapport à l'année précédant l'infection. Le risque était multiplié par 10 pour le virus de la grippe B, par 5 pour le virus de la grippe A, par 3,5 pour le virus respiratoire syncytial (VRS) et par presque 3 pour d'autres virus du type adénovirus, métapneumovirus ou coronavirus (Kwong et al., 2018).

Bien que surtout démontré avec les syndromes coronariens aigus, ce sur-risque est désormais bien établi avec les ischémies cérébrales artérielles (Ohland et al., 2020; Pak et al., 2021).

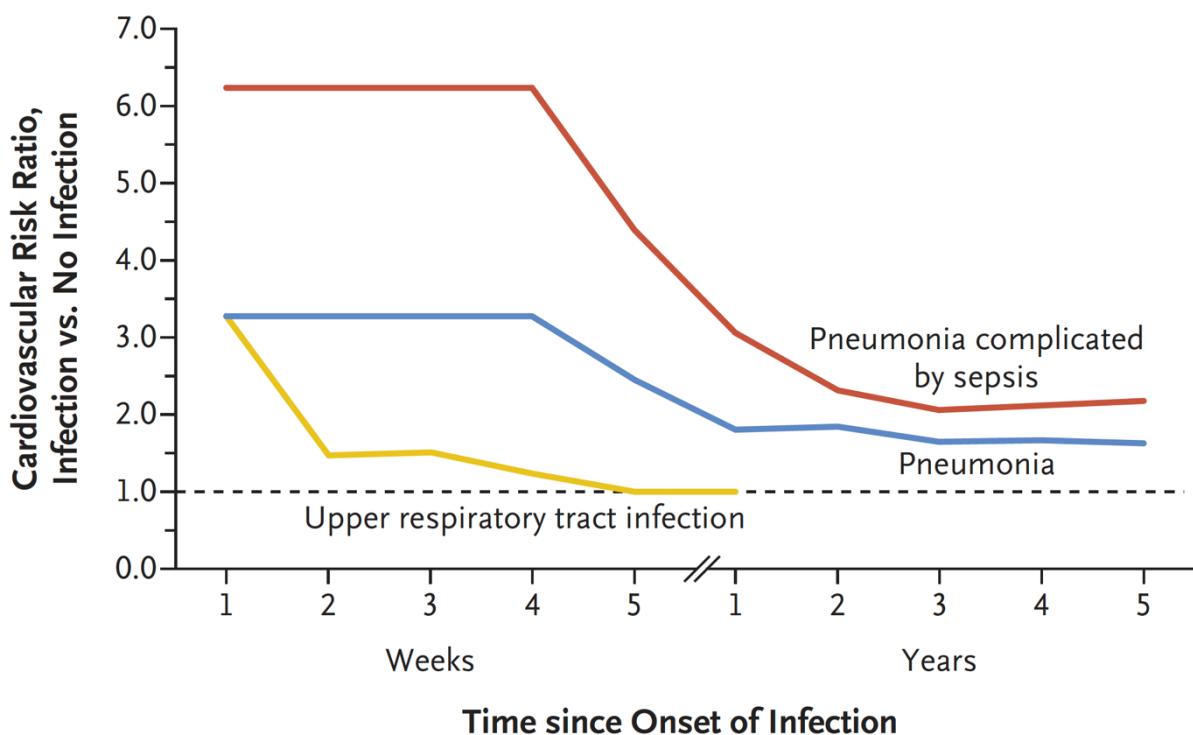


Figure 22 : Évolution temporelle du risque cardio-vasculaire après l'apparition d'une infection aiguë.

Issu de Musher et al., 2019.

La physiopathologie de ces événements est complexe et repose en partie sur les complications secondaires à la dysfonction endothéliale décrites plus haut, comme l'orientation vers un phénotype pro-adhésif, pro-thrombotique et pro-coagulant. Mais aussi sur les conséquences

générales du sepsis (Musher et al., 2019), telles l'inflammation et l'hyperthermie qui augmentent le métabolisme basal et donc la demande en oxygène, entraînant dans le même temps une tachycardie réflexe aboutissant à une baisse du temps de perfusion diastolique des coronaires (Figure 23) (Ferro et al., 1995). Il peut s'y associer une hypoxémie quand l'infection est respiratoire voire une hypoxie quand il s'agit d'un état de choc septique même sans atteinte respiratoire. Parfois le débit coronaire peut être diminué, en cas de cardiomyopathie septique notamment (Hollenberg & Singer, 2021). Enfin, au niveau coronarien, les plaques d'athérome contiennent des cellules inflammatoires qui vont être activées par les cytokines inflammatoires circulantes lors d'un sepsis, peu importe sa localisation dans l'organisme. Et ceci, même au sein des plaques stables (Mauriello et al., 2005).

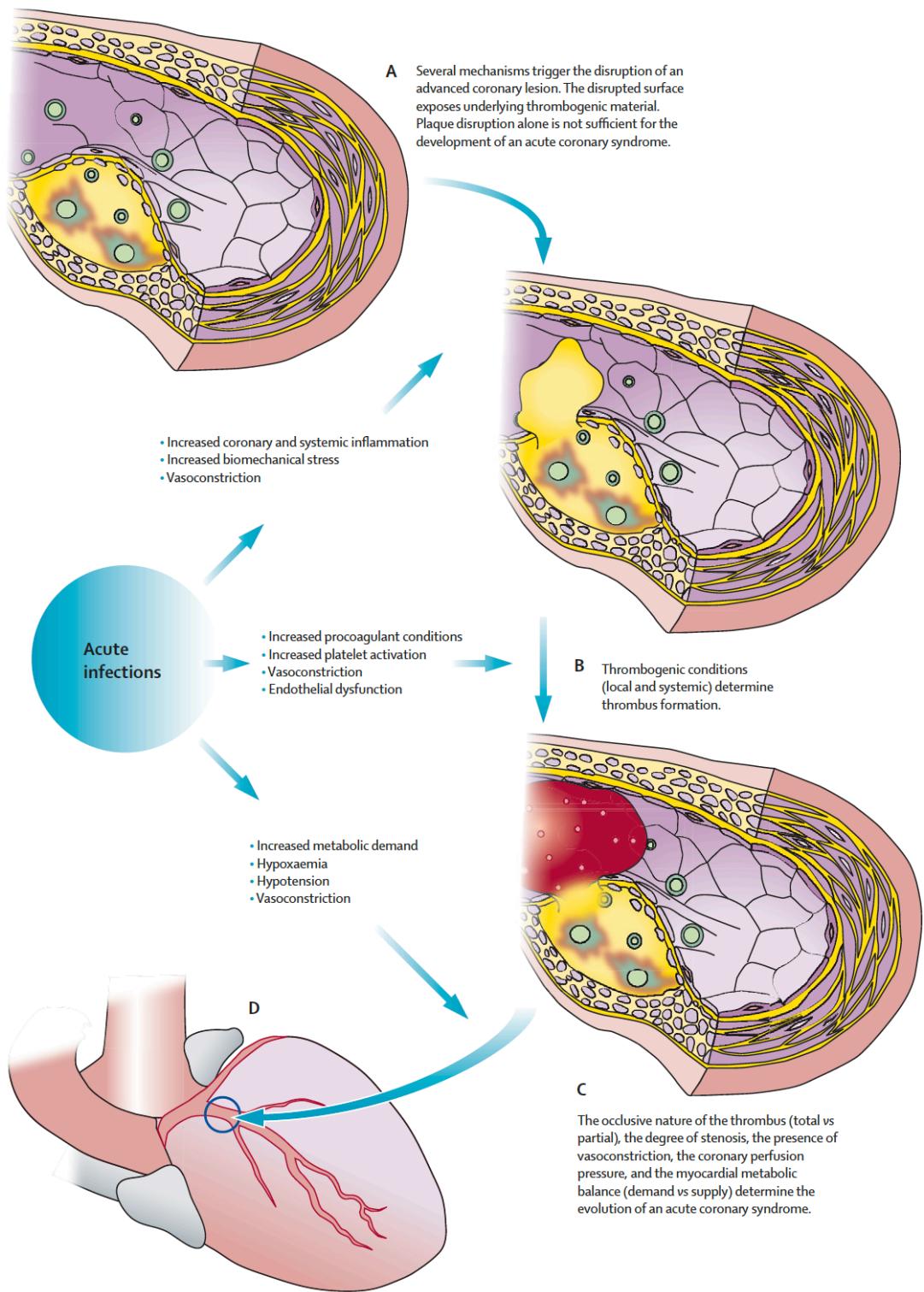


Figure 23 : Mécanismes physiopathologiques favorisant la survenue de syndromes coronariens aigus au cours d'un sepsis.

Les conditions créées par les infections aiguës peuvent faire évoluer une lésion coronaire avancée vers un syndrome coronarien aigu (D). **Issu de Corrales-Medina et al., 2010.**

III.E.2 Complications cardio-vasculaires du sepsis à long terme

Bien qu'avec le temps le risque diminue progressivement, il ne revient toutefois jamais au niveau de base attendu pour un patient apparié avec les mêmes caractéristiques mais qui n'aurait pas fait de sepsis. En effet, plus l'infection est grave, plus l'association est forte et plus longtemps le sur-risque va perdurer de manière importante (Figure 22).

III.E.2.a Major adverse cardiovascular events (MACEs)

Les évènements cardio-vasculaires tels que les syndromes coronariens aigus et les ischémies cérébrales artérielles sont parfois regroupés sous le terme de MACEs, un acronyme anglais signifiant *major adverse cardiovascular events*. C'est le score composite, le plus utilisé de nos jours dans les recherches sur les maladies cardiovasculaires. Il a été décrit initialement comme un score associant infarctus du myocarde non fatal, accident vasculaire cérébral non fatal et décès cardiovasculaire (*classical 3-point MACE ou 3P-MACE*) (Kip et al., 2008). Dans des versions plus modernes, il peut également inclure une hospitalisation pour insuffisance cardiaque aiguë en plus (4P-MACE).

III.E.2.b Les complications cardio-vasculaires post-sepsis, une menace émergente de santé publique

Ainsi, les survivants d'un sepsis présentent un risque accru de développer une complication cardiovasculaire avec un nombre élevé d'événements cardiovasculaires indésirables majeurs (MACEs) durant plusieurs années. L'hospitalisation pour une pneumonie grave entraîne un risque accru de développer une maladie cardiovasculaire qui persiste pendant au moins 10 ans (Corrales-Medina et al., 2015). Yende et al. ont constaté que les survivants d'un sepsis grave présentaient un risque cardiovasculaire deux fois plus élevé au cours de la première année suivant leur sortie de l'hôpital, par rapport à des personnes appariées en fonction du risque et de l'âge. De façon intéressante, dans cette étude même le sous-groupe de survivants d'un sepsis sans maladie cardiovasculaire avant l'hospitalisation, présentait un risque plus élevé d'événements cardiovasculaires ultérieurs (Yende et al., 2014). Les données les plus

récentes, se basant sur les résultats de 27 études, retrouvent un risque de MACEs augmenté d'environ 70 % jusqu'à 5 ans chez les survivants d'un sepsis par rapport à des patients d'un groupe contrôle (Kosyakovsky et al., 2021). A nouveau, en comparant à grande échelle les patients septiques avec des groupes contrôles de patients hospitalisés ou dans la population, les résultats suggèrent que le risque excédentaire de MACEs observé pourrait ne pas être entièrement attribuable à l'état de santé antérieur, ni à l'impact général de l'hospitalisation et donc au sepsis en lui-même. Ces résultats suggèrent donc que le sepsis à lui seul pourrait représenter un facteur de risque de maladie cardio-vasculaires à long terme, avec des amplitudes de risques relatifs comparables à celles des facteurs de risques cardio-vasculaires classiques tels que la dyslipidémie, l'hypertension et le diabète sucré (Virani et al., 2020). Les auteurs concluent en soulignant que compte-tenu de l'existence de nombreuses stratégies préventives efficaces contre les maladies cardio-vasculaires, les efforts visant à améliorer la stratification et l'optimisation du risque cardiovasculaire chez les survivants d'un sepsis pourraient représenter une occasion, à ce jour sous-utilisée, d'améliorer la survie à long terme du sepsis.

L'une des causes de l'impact cardiovasculaire du sepsis serait un taux inhabituellement augmenté d'athérosclérose chez les survivants, dont l'origine et la pathogenèse sont encore mal compris (Mankowski et al., 2019). Ainsi, l'un des acteurs potentiel dans la survenue de ces événements cardio-vasculaires est probablement l'endothélium dû aux répercussions qu'entraîne la dysfonction endothéliale qui pourrait perdurer dans le temps (Musher et al., 2019). Un vieillissement vasculaire accéléré à type de sénescence endothéliale prématuée pouvait être l'un des mécanismes potentiel expliquant une dysfonction endothéliale qui perdure dans le temps favorisant *in fine* l'athérosclérose (Figure 24).

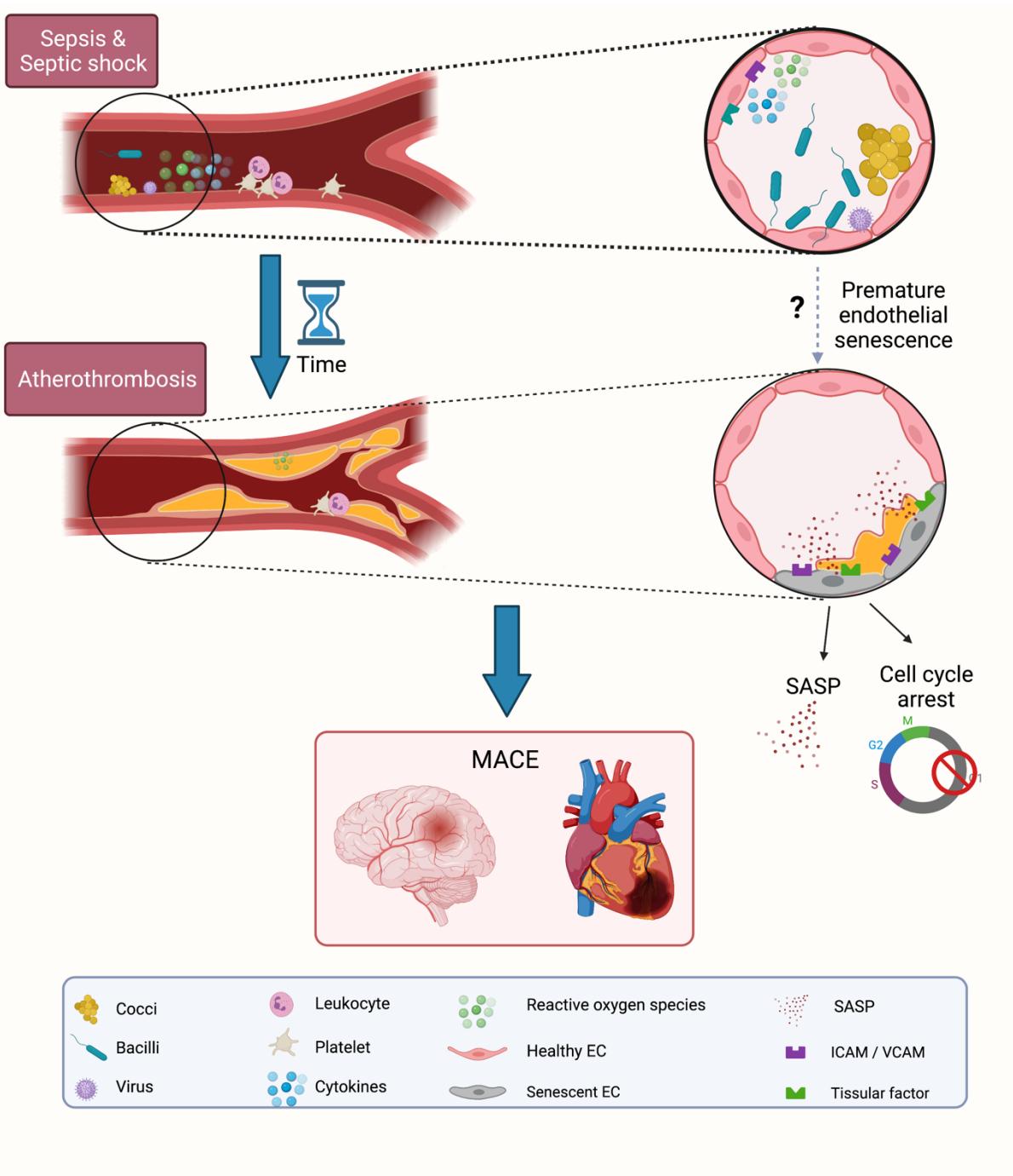


Figure 24 : Représentation des mécanismes potentiels contribuant aux complications cardiovasculaires dues à la sénescence endothéiale accélérée après un sepsis ou un choc septique.

La sénescence prématûre induite par le sepsis pourrait expliquer un processus d'athérogenèse accéléré conduisant à la survenue de complications cardiovasculaires. (SASP: senescent-associated secretory phenotype). **Réalisation personnelle.**

III.E.2.c Sénescence vasculaire, athérosclérose et inflammation

De nombreuses études ont établi le lien entre sénescence vasculaire et athérosclérose (Figure 25). Cette sénescence cellulaire semble même favoriser la survenue de maladies cardio-vasculaires de manière bimodale. Dans un premier temps en favorisant la survenue des plaques d'athérome puis dans un second temps en contribuant au développement de celles-ci. Par ailleurs, en générant un stress local à l'origine d'une SIPS, les lésions d'athéroscléroses peuvent favoriser l'émergence de cellules sénescentes en leur sein.

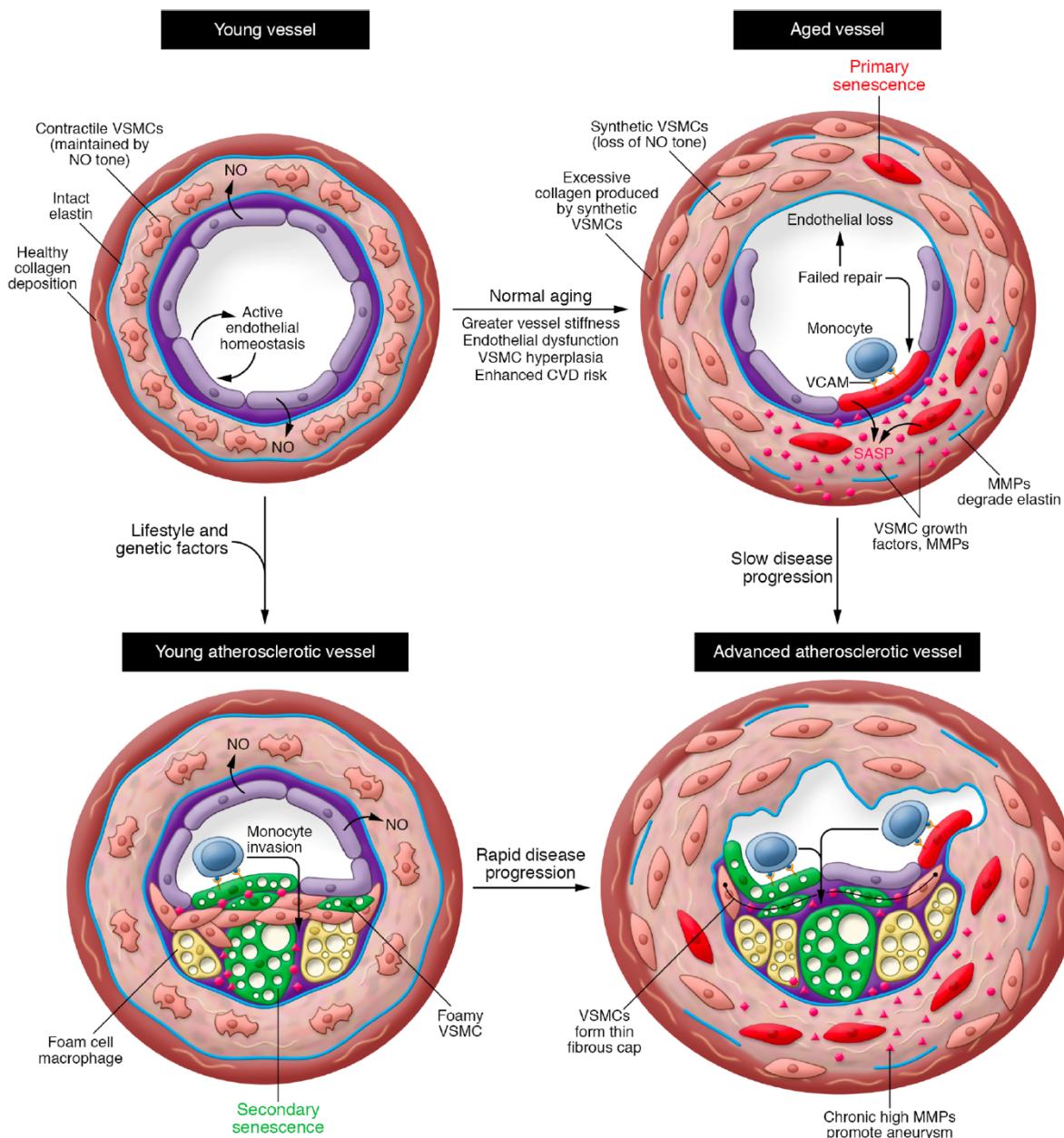


Figure 25 : La sénescence cellulaire est une cause et une conséquence de l'athérosclérose.

Tant les cellules sénescentes réplicatives (dites primaires ici) que les cellules sénescentes induites par SIPS (dites secondaires ici) peuvent favoriser l'athérosclérose. Dans les artères jeunes (en haut à gauche), la charge de sénescence est faible. Au cours du vieillissement normal (en haut à droite), les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) subissent une sénescence réplicative (cellules rouges). Progressivement, même en l'absence de facteurs de risque cardio-vasculaires ou de SIPS, les vaisseaux des personnes âgées peuvent évoluer vers des lésions d'athéroscléroses avancées (en bas à droite). Chez un patient jeune exposé à des facteurs de stress pourvoyeurs de SIPS, les cellules de la paroi vasculaires, telles que les cellules endothéliales, les cellules spumeuses et les VSMC (cellules vertes), peuvent devenir sénescentes de manières prématuées (en bas à gauche). Ce même jeune patient aura une évolution par la suite beaucoup plus rapide vers un état d'athérosclérose avancée (en bas à droite). **Issu de Childs et al., 2018.**

Comme preuve de concept du lien entre la sénescence endothéliale et athérosclérose, un travail pionnier a rapporté la présence de cellules endothéliales sénescentes recouvrant les plaques d'athérosclérose dans des coupes histologiques post-mortem de l'arc aortique de patients âgés de plus de 70 ans. Ces cellules endothéliales représentaient une fine couche continue surexprimant un marqueur biochimique associé à la sénescence, qui était encore plus fortement surreprésenté dans les plaques vulnérables, à savoir la SA- β -Gal (*senescent associated- β -galactosidase*) (Vasile et al., 2001).

Néanmoins, dans les modèles animaux, des signes précoce de sénescence endothéliale sont détectés, déjà chez les individus d'âge moyen, principalement aux sites de flux perturbés et de faibles contraintes de cisaillement au cours de l'athérogenèse. Ces sites sont caractérisés par un dysfonctionnement endothérial précoce, ce qui suggère que le dysfonctionnement endothérial lié au vieillissement prématucléaire peut contribuer à la nature focale de la pathologie mais peut-être aussi à son initiation et à sa progression (Warboys et al., 2014). Dans des modèles de rongeurs ou des échantillons humains, une expression progressive des biomarqueurs de sénescence p53, p21, p16 (ou p16^{INK4a}) et une accumulation de l'activité SA- β -Gal se produisent dans les tissus vasculaires vieillissants, à savoir dans les cellules endothéliales mais aussi dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages (Lin et al., 2015; Melk et al., 2004; Morgan et al., 2013; Rajapakse et al., 2011; Sun et al., 2018; Yang et al., 2007).

Dans un modèle expérimental de souris sujettes à l'athérosclérose, Kaynar et ses collègues (Kaynar et al., 2014) ont corroboré l'association entre le sepsis et la survenue d'événements cardiovasculaires en montrant qu'un sepsis à type de péritonite provoqué par une ligature et ponction cœcale (CLP) accélère la formation de plaques d'athérome aortiques dans les 5 mois qui suivent. Bien que ces résultats confirment l'association entre le sepsis et l'athérosclérose, les auteurs ont conclu que le mécanisme qui sous-tend cette athérogenèse accélérée reste à élucider. Ces données soulignent ainsi la nécessité de développer des modèles murins de suivi à long terme du sepsis.

III.E.2.d Inflammageing

L'un des autres principaux facteurs contribuant au lien entre le sepsis, la sénescence et l'athérosclérose dans les maladies cardiovasculaires est « *l'inflammageing* » (Ferrucci & Fabbri, 2018).

L'inflammageing est un état, qui se développe progressivement avec l'âge, caractérisé par des niveaux élevés de marqueurs pro-inflammatoires dans le sang et d'autres tissus, qui entraîne une forte susceptibilité aux maladies cardio-vasculaires et qui est bien décrit chez les personnes âgées. La physiopathologie de cette inflammation chronique reste mal décryptée à ce jour et semble multifactorielle, reposant sur une dérégulation des cellules immunitaires, une altération du microbiote, une perméabilité intestinale accrue, des infections chroniques et une obésité dite « centrale » (Figure 26) (Ferrucci & Fabbri, 2018). Au niveau cellulaire, cet état est marqué par un stress oxydant médié par les mitochondries, une activation de l'inflamasome NLRP3 et une susceptibilité génétique qui contribuent à l'inflammation ainsi qu'au phénotype sécrétoire pro-inflammatoire associé à la sénescence encore appelé SASP pour *senescence associated secretory phenotype* (Borodkina et al., 2018). Ainsi, les plaques d'athérosclérose avancées présentent à la fois des marqueurs de sénescence tels que l'expression de p16 et du SASP, ce qui alimente l'inflammation et déstabilise la plaque d'athérosclérose, suggérant une contribution clé de l'inflammation dans le mécanisme d'athérosclérose (Wang et al., 2015).

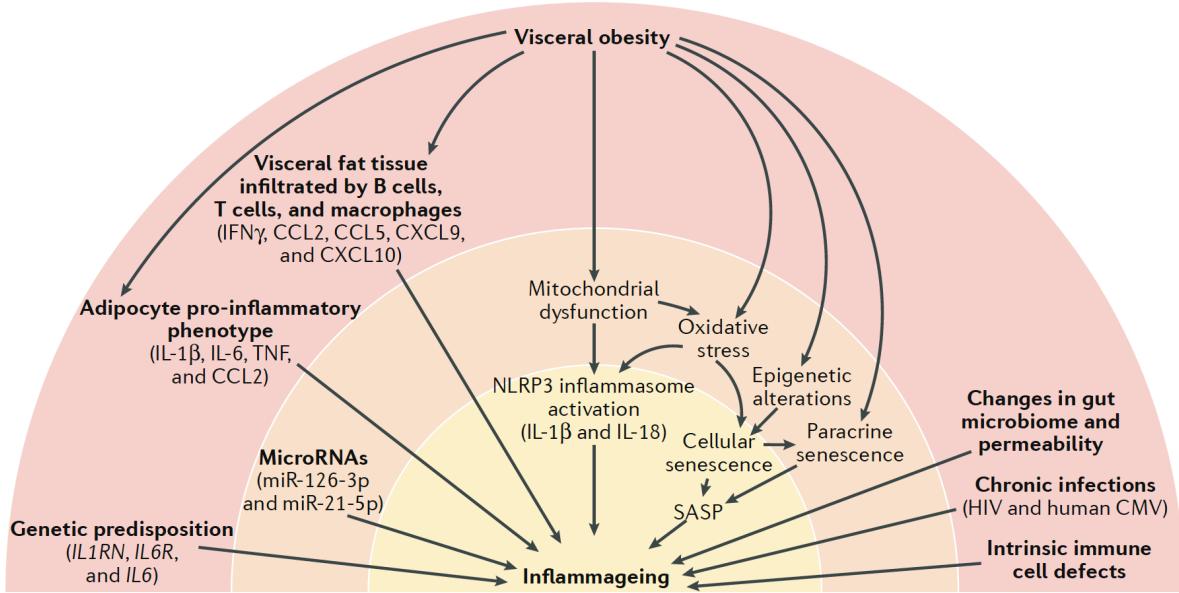


Figure 26 : Etiologies potentielles de l'inflammageing.

(SASP: senescence associated secretory phenotype ; HIV: human immunodeficiency virus ; CMV: cytomegalovirus). **Issu de Ferrucci et al., 2018.**

IV La sénescence

"*Senectus ipsa morbus est*", cet ancien proverbe latin peut être traduit par "La vieillesse est une maladie incurable" ou "La vieillesse elle-même est une maladie".

IV.A Généralités sur le concept de sénescence

Depuis l'époque de la Grèce antique, médecins et philosophes se sont demandés si le vieillissement (ou la sénescence), était une maladie ou un processus naturel (Burstein & Finch, 2018). Certains auteurs appartenant au corpus hippocratique affirmaient que la vieillesse conduisait inévitablement à la fragilité puis à la mort, et considéraient donc le vieillissement comme une maladie incurable. D'autres médecins, comme le grec Claude Galien (129–201) exerçant à Rome, affirmaient que contrairement aux maladies qui sont anormales, le vieillissement est universel et qu'il s'agit donc d'un processus naturel plutôt que d'une maladie. Bien que la réponse ne soit pas encore définitive et que cette dichotomie persiste encore de nos jours, les progrès récents de la biologie nous permettent de mieux comprendre ce concept (Faragher, 2015).

Le mot sénescence est dérivé du mot latin *senex*, qui signifie "vieil homme". Survenant après la phase de maturité, la sénescence se définit comme le vieillissement lent et progressif des tissus et des organes. Ce processus irréversible entraîne une diminution des fonctions et de l'activité de l'organisme, créant son affaiblissement général et conduisant à sa mort.

Au niveau biologique, petit à petit avec l'avancée dans l'âge, de plus en plus de cellules sénescentes vont s'accumuler dans les différents tissus, causant progressivement la dégénérescence tissulaire à l'origine de la lente altération fonctionnelle des organes.

Le déclin des capacités de régénération tissulaire observé avec l'avancée en âge soulève la question de l'intérêt de ce processus de sénescence chez les espèces. Partant de ce constat de nombreuses théories ont été élaborées par les chercheurs pour tenter d'apporter une explication rationnelle scientifique à ce phénomène.

IV.B Théorie de la pléiotropie antagoniste

Bien que peu connus, il existe des effets bénéfiques de la sénescence dans certains contextes survenant principalement, mais pas uniquement, au début de la vie. Ainsi, les mécanismes de sénescence sont bénéfiques dans le développement embryonnaire (Muñoz-Espin et al., 2013; Storer et al., 2013), la cicatrisation des plaies et la réparation de tissus (Demaria et al., 2014) et dans certaines conditions en limitant la transformation néoplasique (Collado et al., 2007).

Cependant, de manière plus connue et mieux documentée, lorsque les cellules sénescentes s'accumulent plus tard dans la vie, elles contribuent au dysfonctionnement des tissus dans le contexte du vieillissement et des troubles liés à l'âge (Gorgoulis et al., 2019). De manière intéressante, même une proportion relativement faible de cellules sénescentes de l'ordre de 10 à 15 % chez des primates âgés (Herbig et al., 2006) est suffisante pour provoquer un dysfonctionnement des tissus (Xu et al., 2018).

La sénescence a donc des effets à la fois positifs et négatifs selon les contextes physiologiques et surtout selon l'âge. C'est en se basant sur ces observations que le biologiste américain George C. Williams a élaboré la théorie de la pléiotropie antagoniste (Mitteldorf, 2019). Cette hypothèse évolutive repose sur le fait que des mécanismes jugés bénéfiques pour un organisme au début de sa vie peuvent avoir des effets néfastes plus tard et notamment après la période d'activité de reproduction.

Pour mieux comprendre cette théorie, il convient de revenir sur la théorie Darwinienne de « sélection naturelle », selon laquelle les individus d'une espèce les mieux adaptés vont survivre et se reproduire davantage de manière à assurer la pérennisation de l'espèce (Ayala, 2009). Cette « pression de sélection » se faisant généralement avant la période de reproduction, de sorte que seuls les mieux adaptés se reproduisent.

Ceci permet donc de mieux comprendre la théorie de pléiotropie antagoniste de William selon laquelle les gènes et mécanismes qui causent la sénescence ne sont pas éliminés par l'évolution, non seulement parce que leurs effets délétères se manifestent après la période de reproduction, mais surtout parce qu'ils ont un effet bénéfique avant. Cette théorie explique ainsi pourquoi un désavantage adaptatif, tel que le mécanisme de sénescence,

survenant après la période de reproduction, à un moment où la « pression de sélection » est moindre, a pu se perpétrer dans le temps.

IV.C Sénescence réplicative

Au niveau cellulaire, la sénescence est un état caractérisé par un arrêt permanent de la réplication dans des cellules normalement prolifératives au préalable, où ces cellules perdent la capacité de se diviser (Figure 27) (Burton & Krizhanovsky, 2014). Les cellules sénescentes ne sont pas équivalentes aux cellules quiescentes ou aux cellules mortes. Au contraire, les cellules sénescentes restent vivantes et métaboliquement actives pendant de longues périodes (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Outre la sortie du cycle cellulaire, l'état de sénescence s'accompagne d'une incapacité à réintégrer le cycle cellulaire en réponse à des stimuli mitogènes. D'autres traits caractéristiques de la sénescence sont une reprogrammation métabolique, un réarrangement anormal de la chromatine comme les foyers d'hétérochromatine, également appelés *senescence-associated heterochromatic foci* (SAHF), à la suite desquels les gènes liés à la prolifération sont réduits au silence ainsi que l'autophagie. Enfin, l'une des caractéristiques majeures des cellules sénescentes est la présence d'un SASP qui initie une diffusion paracrine d'un signal oxydatif et pro-inflammatoire. Ce SASP définit la capacité des cellules sénescentes à exprimer et à sécréter un large éventail de modulateurs extracellulaires, notamment des cytokines, des chimiokines, des protéases, des facteurs de croissance et des lipides.

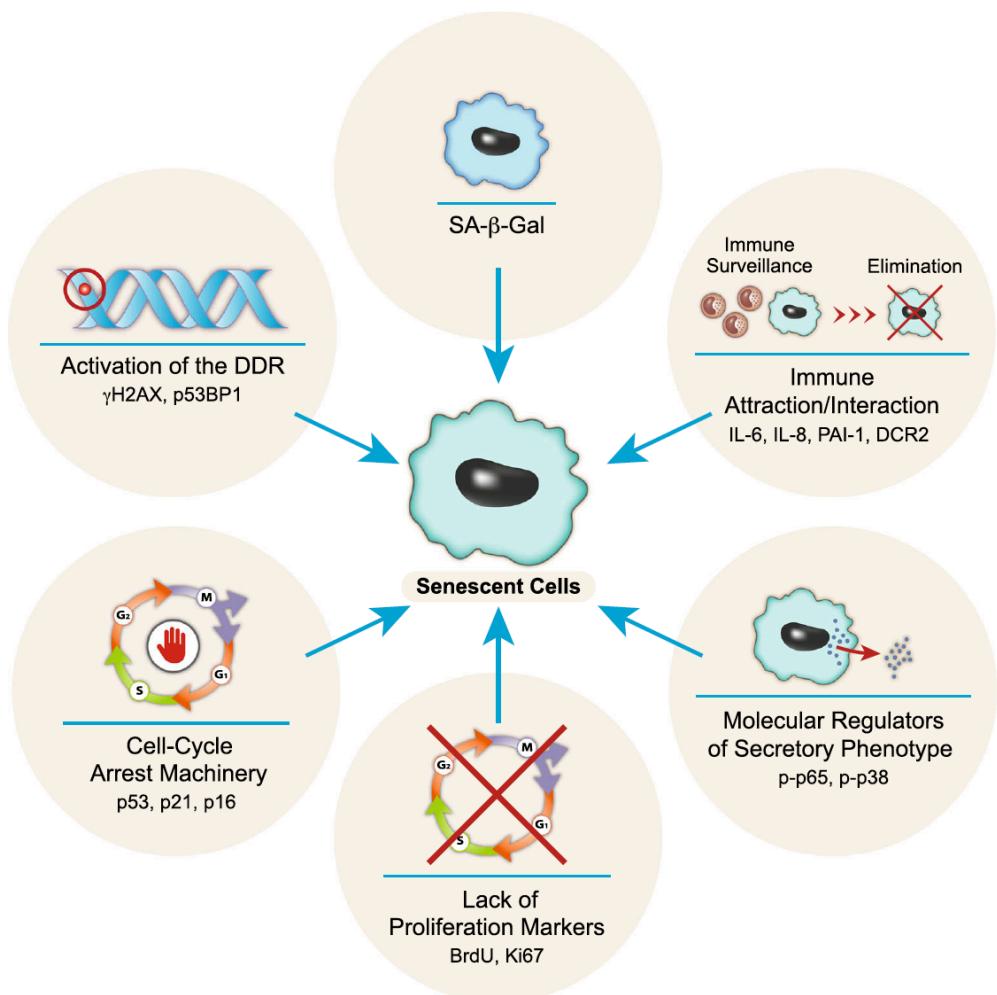


Figure 27 : Caractéristiques générales des cellules sénescentes.

En l'absence du Gold-standard, une combinaison de marqueurs représentant différentes signatures moléculaires de la sénescence peut augmenter la validité de l'identification. **Issu de Burton et al., 2014.**

Au niveau de l'organisme, en imposant un arrêt de croissance, la sénescence peut apparaître comme un mécanisme de défense qui limite la réplication de cellules anciennes ou endommagées et préserve ainsi l'équilibre homéostatique (Figure 28) (Muñoz-Espin & Serrano, 2014). A titre d'exemple, le SASP peut intervenir dans les mécanismes suppresseurs de tumeurs et dans ceux de cicatrisation des plaies, mais aussi dans l'inflammation chronique et les maladies liées à l'âge.

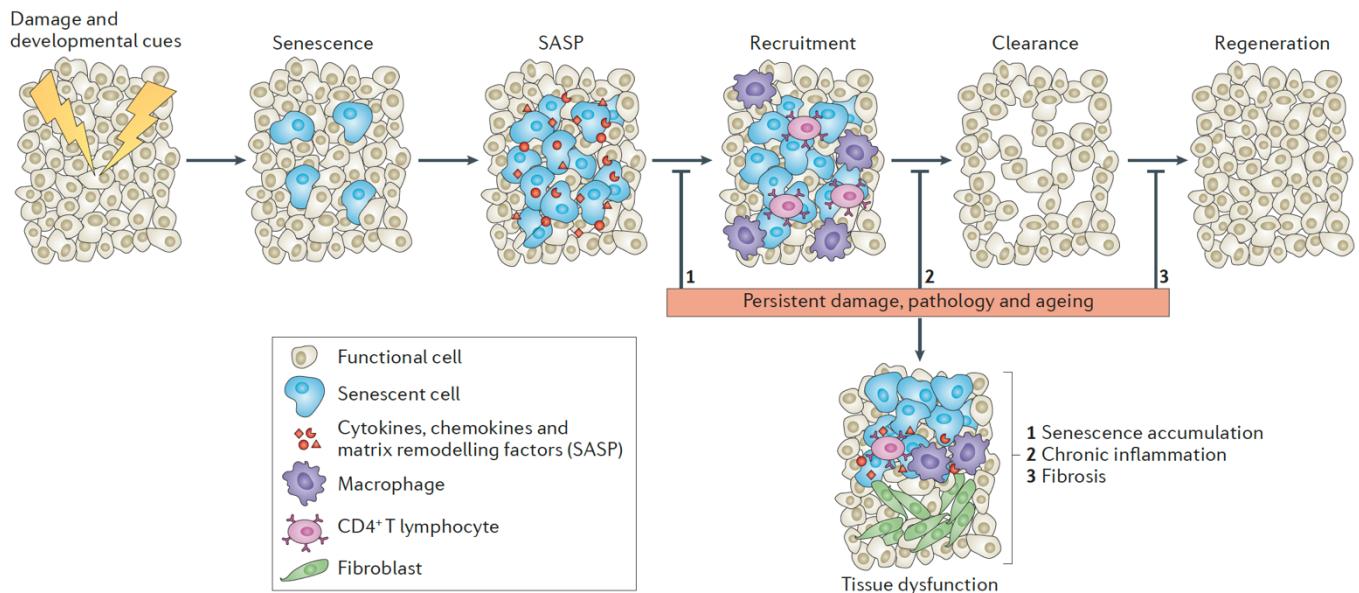


Figure 28 : Modèle simplifié de la sénescence.

À la suite d'un stimulus, les cellules sénescentes s'accumulent et initient un processus de remodelage des tissus en recrutant des cellules immunitaires par le biais du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). En condition d'homéostasie, les macrophages éliminent les cellules sénescentes, ainsi les cellules progénitrices repeuplent et régénèrent le tissu endommagé. Cette séquence sénescence-élimination-régénération peut être altérée par des dommages persistants, des états pathologiques ou le vieillissement. Dans ces cas, les cellules sénescentes ne sont plus éliminées efficacement et le tissu n'est pas entièrement régénéré. La résolution du dommage dans ces cas implique une cicatrice fibrotique avec des cellules sénescentes, des cellules inflammatoires et du tissu fibrotique. **Issu de Muñoz-Espín et al., 2014.**

La "sénescence réplicative" est considérée comme une horloge biologique déclenchée par le vieillissement. Elle est causée par un raccourcissement progressif des télomères à chaque division cellulaire, un contrôle physiologique de l'instabilité génomique limitant l'accumulation de dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les télomères sont des régions hautement répétitives de l'ADN, situées aux deux extrémités de chaque chromosome chez les eucaryotes (Shay & Wright, 2019). Il s'agit de structures associées à des protéines spécifiques protégeant le génome contre les dégradations nucléolytiques, les recombinaisons et réparations inutiles et la fusion interchromosomique. A chaque cycle de réplication, les télomères se raccourcissent ou deviennent dysfonctionnels, ce qui peut entraîner une réponse aux dommages causés à l'ADN. La télomérase, une transcriptase inverse, s'oppose à ce raccourcissement par un mécanisme de ré-élongation.

En 1961, Leonard Hayflick et Paul Moorheads ont décrit pour la première fois la "limite de Hayflick" lorsqu'ils ont démontré que la capacité de prolifération des fibroblastes humains *in-vitro* était limitée (Hayflick & Moorhead, 1961). Ils ont observé qu'après environ 50 divisions cellulaires, le nombre de mitoses tombait à zéro, malgré l'ajout de facteurs de croissance dans le milieu de culture et l'absence d'inhibition de contact. Au départ, plusieurs membres de la communauté scientifique étaient sceptiques, affirmant qu'il s'agissait d'un artefact *in-vitro* isolé. Cependant ce concept s'est progressivement imposé devant l'accumulation de preuves à la fois *in-vitro* et *in vivo*. Aujourd'hui, de nombreuses études montrent que la sénescence est une véritable réponse biologique (Kelley et al., 2020) qui apparaît progressivement dans les pathologies liées à l'âge, notamment le diabète de type 2, l'obésité, l'athérosclérose, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la fibrose pulmonaire et de nombreuses autres maladies (Childs et al., 2017). Au cours des dernières décennies, l'amélioration de la santé publique a prolongé la durée de vie humaine, favorisant ainsi l'émergence de la sénescence comme facteur contributif majeur aux maladies chroniques chez les personnes âgées (Song et al., 2020).

IV.D Sénescence accélérée : un vieillissement induit par le stress

En 2000, les travaux pionniers d'Olivier Toussaint et de ses collaborateurs à Namur en Belgique ont montré qu'il existe une autre voie, ne relevant pas du vieillissement dû à l'avancée en âge, que les cellules peuvent utiliser pour devenir sénescentes. Ces travaux ont mis en évidence qu'un stress cellulaire important peut déclencher la sénescence, même chez des cellules jeunes, par un phénomène connu sous le nom de SIPS (Toussaint et al., 2000). De nombreuses observations *in-vitro* et *in vivo* ont confirmé et mis en évidence les molécules pouvant initier cette SIPS dans diverses conditions physiopathologiques (Petrova et al., 2016). L'exposition de cellules à des niveaux sub-létaux de stress, tels que les rayonnements ionisants, les ultraviolets, le peroxyde d'hydrogène ou d'autres molécules à l'origine d'un stress oxydant, les toxiques (comme certaines chimiothérapies) peut conduire à la sénescence cellulaire.

Les études ont démontré ce mécanisme de SIPS sur de nombreux types cellulaires, tels les cellules épithéliales, endothéliales, les fibroblastes, les mélanocytes, etc.). La différence majeure entre la sénescence réplicative et la SIPS réside dans le fait que la sénescence

réplicative intervient de manière programmée, après plusieurs réplications cellulaires lorsque que les télomères sont trop courts. Contrairement à la SIPS qui peut survenir à tout moment suite à un stress important, peu importe l'âge de la cellule.

Des études récentes suggèrent que le sepsis, au cours duquel de nombreux facteurs de stress sont sévèrement et significativement exacerbés, est l'une de ces conditions pouvant déclencher cette sénescence prématuée induite par le stress, parfois aussi appelée sénescence accélérée.

Malgré les avancées scientifiques dans l'étude de la sénescence, de nombreux aspects restent encore mal élucidés. Les mécanismes d'induction de la sénescence sont nombreux et variables d'un tissu à l'autre. De même, les marqueurs de sénescence utilisés ne sont souvent pas absolument spécifiques du processus de sénescence et nécessitent d'être optimisés. Une meilleure compréhension de ces différents mécanismes inducteurs et des voies qu'ils activent ou inactivent par la suite représentent ainsi un réel enjeu dans la lutte contre les pathologies liées non plus seulement à l'âge mais plus généralement à la sénescence.

IV.E Caractéristiques des cellules sénescentes

En dehors du raccourcissement des télomères, caractéristique spécifique de la sénescence réplicative, les cellules sénescentes issues d'une SIPS partagent quasiment toutes les autres caractéristiques des cellules sénescentes.

IV.E.1 Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal)

Plusieurs marqueurs sont utilisés pour détecter les cellules sénescentes, parmi lesquels l'activité bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal) est actuellement le « gold standard » pour la détection de la sénescence in-vitro (Itahana et al., 2007). Cependant, la mesure de l'activité SA- β -Gal est une évaluation comparative. *in vivo*, sa grande sensibilité aux conditions d'échantillonnage et de stockage et la nécessité d'un témoin non sénescents rendent l'évaluation difficile.

L'élévation de l'activité SA- β -Gal dans les cellules sénescentes est la conséquence à la fois de l'augmentation de la β -galactosidase (Lee et al., 2006) qui est une enzyme de type hydrolase, et d'une augmentation de la masse des lysosomes dans lesquelles se trouvent cette dernière (Kurz et al., 2000). Bien que l'activité de la β -galactosidase augmente dans les cellules sénescentes, on observe paradoxalement un déclin de la capacité de dégradation des lysosomes. La β -Galactosidase opère strictement à pH 4,5 dans les cellules saines alors qu'elle est encore active à un pH de 6 dans les cellules sénescentes permettant ainsi la quantification d'une activité β -Galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal) (Dimri et al., 1995), l'un des premiers marqueurs à avoir été utilisé pour définir la sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Il existe une corrélation positive entre la SA- β -Gal et le nombre de passages cellulaires représentant la sénescence réplicative (Yang & Hu, 2004) et aussi entre la SA- β -Gal et la SIPS (Adewoye et al., 2020).

IV.E.2 Arrêt du cycle cellulaire

Une caractéristique déterminante de tous les types de sénescence cellulaire est la mise en évidence de l'arrêt du cycle cellulaire, souvent utilisé comme marqueur alternatif de la sénescence. Cet arrêt du cycle cellulaire se manifeste notamment par une augmentation des protéines p53, p21 et p16. Cependant, il ne peut être considéré à lui seul comme un véritable marqueur de substitution de la sénescence, car de multiples autres réponses cellulaires peuvent entraîner un arrêt réplicatif stable. Ces marqueurs n'en demeurent pas moins extrêmement pertinents puisque l'incapacité d'exprimer des gènes de prolifération, même dans un environnement promitogène (Dimri & Campisi, 1994; Dimri et al., 1996), distingue la « sénescence » d'un autre état potentiellement confondant qu'est la « quiescence ». La quiescence cellulaire étant un état non prolifératif des cellules qui est facilement inversé en réponse à des mitogènes (Tableau 3).

Il est à noter que la voie mTOR joue un rôle clé dans le passage de la sénescence à la quiescence : lorsque p53 et mTOR sont tous deux activés, les cellules deviennent sénescentes, mais lorsque p53 est activé seul sans activation de mTOR, les cellules deviennent quiescentes (Korotchkina et al., 2010). Ainsi, en l'absence d'évaluation directe fiable possible de la

sénescence comme avec la mesure de l'activité SA- β -Gal, plusieurs marqueurs non exclusifs sont actuellement étudiés pour le suivi de la sénescence cellulaire.

	Senescence	Quiescence
Definition	A cellular state characterized by an arrested cell cycle, enlarged and flattened cell shape, enhanced β -galactosidase activity, but active metabolism and the development of an immunogenic phenotype consisting of a proinflammatory secretome, usually termed the SASP	A special phase of cell cycle, usually referred to as the G_0 phase, when a cell is not dividing but has metabolic activity similar to its proliferating counterparts and secretes proteins that help to maintain tissues
Cell type	Many if not most replication-competent cells (fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, adipocytes, pericytes, neuroendocrine cells, immune cells, mesenchymal stem cells, etc.)	Many if not all dividing cells (somatic stem and progenitor cells, lymphocytes, hepatocytes, renal/pulmonary epithelial cells, chondrocytes, glia, etc.)
Growth arrest	Essentially permanent	Generally reversible
DNA content	2N or 4N	2N
Effectors	$p16^{INK4a}$, $p14/p19^{ARF}$, $p21^{CIP1}$, p53, and Rb	$p18^{INK4c}$, $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$, p107, p130, and repressive E2Fs
Markers	Shortened, dysfunctional telomeres, $p16^{INK4a}$ expression, SAHF	Low RNA content and lack of cell proliferation markers, as well as label retention as an indication of low turnover [102]
	Persistent DDR, SASP, SA- β -gal positivity, lamin B1 loss, p38MAPK and NF- κ B activation	

Tableau 3 : Comparaison de la sénescence cellulaire avec la quiescence.

(DDR: DNA damage response ; MAPK: mitogen-activated protein kinase ; SA- β -Gal: senescence-associated β -galactosidase; SAHF : senescence associated heterochromatin foci ; SASP : senescence-associated secretory phenotype). **Issu de Sun et al., 2018.**

IV.E.3 *Senescence-associated secretory phenotype » (SASP)*

Le changement de phénotype cellulaire des cellules sénescantes vers un SASP, également appelé sécrétome de signalisation de la sénescence (Kuilman & Peeper, 2009) est sans aucun doute l'un des traits les plus caractéristiques et les plus pertinents des cellules sénescantes de même qu'un biomarqueur. Le SASP est associé à la sécrétion d'une pléthore de modulateurs immunitaires, de cytokines inflammatoires, de facteurs de croissance, de chimiokines et de protéases dans le microenvironnement proche des cellules sénescentes.

Chaque lignée cellulaire sénescante est caractérisée par un modèle de SASP spécifique de molécules sécrétées, certaines études suggérant jusqu'à 103 molécules par type de cellule (Childs et al., 2017). Ces molécules sécrétées peuvent varier selon le mécanisme initiateur de la sénescence (Basisty et al., 2020). Les éléments clés qui composent habituellement ce SASP sont le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 α jouant un rôle juxtacrine sur les cellules environnantes mais aussi les métalloprotéinases matricielles (MMP-1 et -3) agissant sur le remodelage de la matrice extracellulaire (Tchkonia et al., 2013). Le SASP s'appuie sur des voies de signalisation pro-inflammatoires, notamment NF- κ B, mTOR et p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Cuollo et al., 2020).

IV.E.4 *Autophagie*

Parmi les altérations du métabolisme des cellules sénescantes, l'altération de l'autophagie est fréquemment retrouvée. L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion permettant la dégradation de protéines et d'organites intracellulaire par les lysosomes. La découverte de gènes baptisés ATG (pour *autophagy-related genes*) impliqués dans la formation de l'autophagosome a valu le prix Nobel de médecine au japonais Yoshinori Ohsumi en 2016. Il existe trois types d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones et la principale, la macro-autophagie (Mizushima, 2018). L'autophagie permet ainsi de renouveler les structures cellulaires internes afin de limiter l'accumulation de composés cytoxiques *via* le lysosome capable de dégrader toutes les classes de macromolécules grâce à de nombreuses enzymes digestives et une acidité environ 100 fois

plus élevée que celle du cytoplasme. Les produits issus de cette dégradation (acides aminés, acides gras, monosaccharides et nucléosides provenant de la dégradation de protéines, lipides, oligosaccharides et acides nucléiques respectivement) sont ensuite recyclés dans le cytoplasme pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Dikic & Elazar, 2018).

Au cours de la sénescence réplicative, les capacités autophagiques des cellules diminuent progressivement. La balance entre anabolisme et catabolisme cellulaires repose en partie sur mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) qui est le maître régulateur du flux autophagique. Son activation par la voie PI3K/Akt conduit à une augmentation de la protéogénèse et de la lipogénèse ainsi qu'à une diminution de l'autophagie (Saxton & Sabatini, 2017). A titre d'exemple, au cours de la sénescence réplicative dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la protéine kinase mTOR qui est le centre catalytique des complexes mTORC1 et mTORC2, voit son expression et son activation augmenter progressivement (Zhan et al., 2018). Inversement, l'inhibition de mTOR permet d'activer l'autophagie et ainsi de prévenir la sénescence dans le tissu cardiaque (Inuzuka et al., 2009; Zhou et al., 2013). Bien qu'incomplètement élucidés à ce jour, les effets pro-sénescents d'un défaut d'autophagie semblent avoir pour origine une accumulation de p62 dans les cellules (séquestosome 1) (Grootaert et al., 2015). Il s'agit d'une protéine adaptatrice aussi appelée *ubiquitin-binding protein p62* permettant, entre autres, de lier des cargos (comme des protéines ubiquitinylées) à la membrane d'autophagosomes.

En outre, les cellules sénescentes présentent des niveaux réduits de mitophagie (autophagie mitochondriale), entraînant un réseau mitochondrial défectueux pouvant contribuer au dysfonctionnement métabolique (Sun et al., 2016).

IV.E.5 *Consensus de l'International Cell Senescence Association (ICSA)*

En 2019, l'*International Cell Senescence Association (ICSA)* a publié un consensus dans le journal *Cell* qui définit et discute les principales caractéristiques cellulaires et moléculaires de la sénescence et propose des recommandations sur la manière de les utiliser comme biomarqueurs (Gorgoulis et al., 2019). Ce consortium propose aussi un algorithme permettant d'évaluer et de quantifier précisément la sénescence, tant *in-vitro* qu'*in vivo* (Figure 29). En insistant sur l'absence de biomarqueurs de spécificité absolue de la sénescence, les auteurs

proposent une approche se basant sur une combinaison de marqueurs de la sénescence. Enfin, une ressource pour faciliter l'identification des gènes liés à la sénescence a aussi été mise en ligne. Il s'agit de SeneQuest, disponible à l'adresse suivante : <http://Senequest.net>.

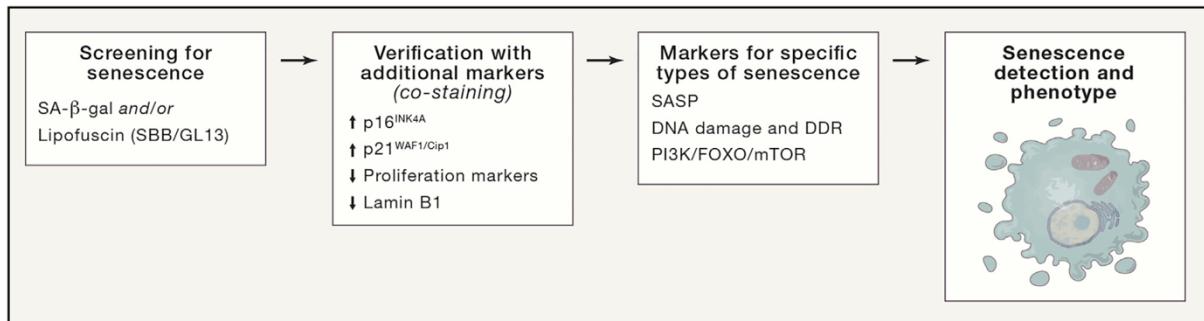


Figure 29 : Algorithme en trois étapes se basant sur des combinaisons de marqueurs multiples pour optimiser la détection des cellules sénescentes.

La première étape comprend l'évaluation de l'activité de la SA-β-Gal et/ou l'accumulation de lipofuscine (coloration SBB ou GL13). Deuxièmement, coloration conjointe avec d'autres marqueurs fréquemment observés dans les cellules sénescentes ($p16^{INK4A}$, $p21$) ou absents de celles-ci (marqueurs de prolifération, lamine B1). Troisièmement, identification des facteurs dont on prévoit qu'ils seront altérés dans des contextes de sénescence spécifiques. **Issu de Gorgoulis et al., 2019.**

IV.F Sénescence endothéiale et vieillissement vasculaire

La sénescence endothéiale est associée à des changements morphologiques et métaboliques. La cellule endothéiale s'aplatit (« *fried egg* » morphology) et s'agrandit avec un noyau de plus en plus polypoïde (figure 30).

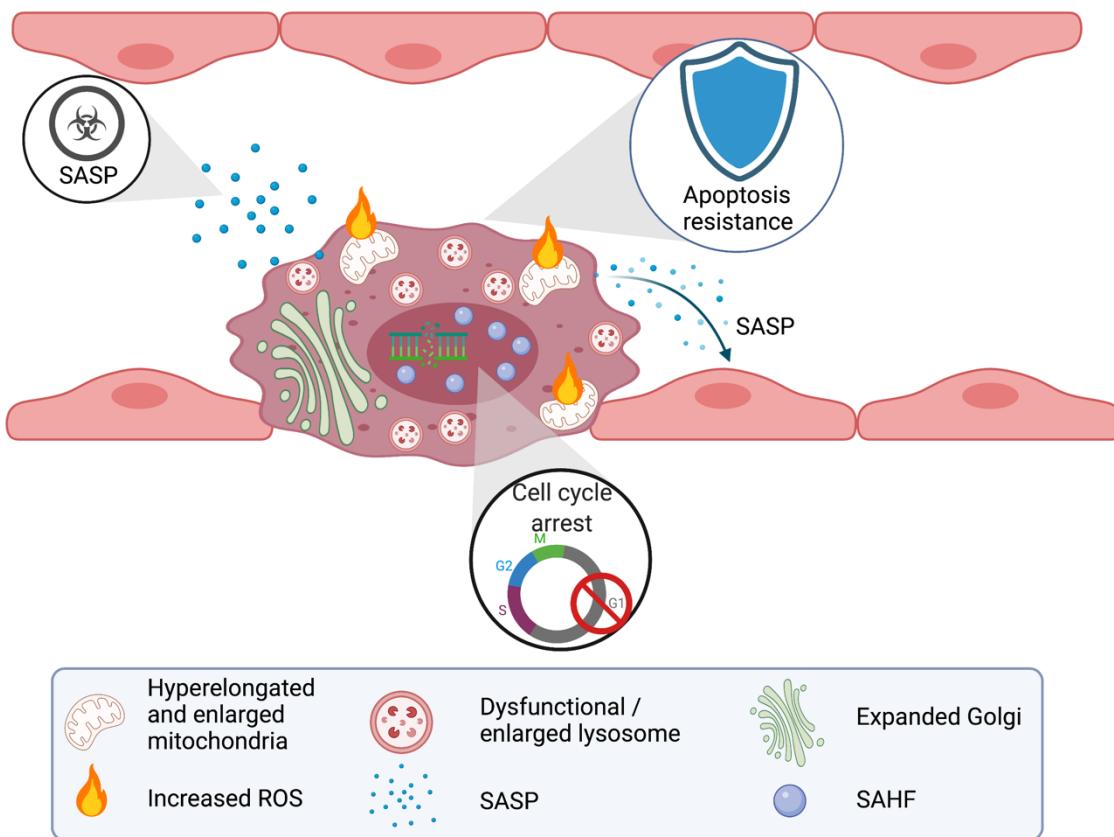


Figure 30 : Caractéristiques des cellules endothéliales sénescentes.

Les cellules sénescentes deviennent irrégulières et plates avec un élargissement cytoplasmique et nucléaire. Elles présentent des modifications multiples des organelles, notamment des lysosomes élargis et dysfonctionnels renfermant des agrégats de lipides et de protéines mais aussi des mitochondries hyper allongées résultant d'un déséquilibre de la fission et de la fusion mitochondrielles, favorisant ainsi la génération de ROS. On observe également un appareil de Golgi élargi, ainsi qu'un élargissement nucléaire et une condensation de la chromatine nommée SAHF. Les dysfonctionnements associés à la sénescence comprennent le SASP avec des effets autocrines et paracrines mais aussi la résistance à l'apoptose et enfin l'arrêt du cycle cellulaire. (ROS: reactive oxygen species ; SAHF: senescent-associated heterochromatin foci ; SASP: senescent associated secretory phenotype). **Réalisation personnelle.**

Ces changements s'accompagnent d'une perte d'intégrité du cytosquelette et d'une altération de l'angiogenèse, de la prolifération et de la migration cellulaire (Uryga & Bennett, 2016). Les cellules endothéliales sénescentes sont marquées par une diminution de leur production de NO ainsi qu'une augmentation de la libération d'endotheline-1 (ET-1) et de la réponse inflammatoire (Olmos et al., 2017). Elles présentent enfin un profil SASP spécifique, listé dans le tableau 4 (Csizsar et al., 2004; Donato et al., 2015; Khan et al., 2017; Ungvari et al., 2013).

Main endothelial SASP components

Pro-inflammatory mediators	TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, CSFs
Pro-inflammatory chemokines	CXCL-1, CXCL-8, CCL-2
Proteases and mediators of tissue remodelling	MMPs, PAI-1
Growth factors	VEGF, EGF, IGFBPs

Tableau 4 : Principaux composants du SASP endothérial.

(TNF- α : tumor necrosis factor alpha, TGF- β : transforming growth factor beta, IL-1: interleukin-1, IL-6: interleukin-6, CSFs: colony-stimulating factor, CXCL-1: chemokine (C-X-C motif) ligand-1, CXCL-8: chemokine (C-X-C motif) ligand-8, CCL-2: C-C Motif Chemokine Ligand 2, MMPs: matrix metalloproteinases, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, VEGF: vascular endothelial growth factor, EGF: Epidermal growth factor, IGFBPs: insulin-like growth factor-binding protein). **Réalisation personnelle.**

Dans des circonstances normales, l'endothélium vasculaire est la clé de l'homéostasie vasculaire, *via* la régulation du tonus vasculaire, la limitation des réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes ainsi que la néovascularisation (Eelen et al., 2018). Ainsi, l'accumulation de cellules endothéliales sénescantes dans la paroi vasculaire induit des changements vasculaires structurels et fonctionnels qui font passer l'endothélium d'une monocouche protectrice à une barrière dysfonctionnelle pro-inflammatoire et athérothrombogène favorisant la survenue de maladies cardio-vasculaires (Katsuumi et al., 2018) (Figure 31).

Senescent endothelial cell

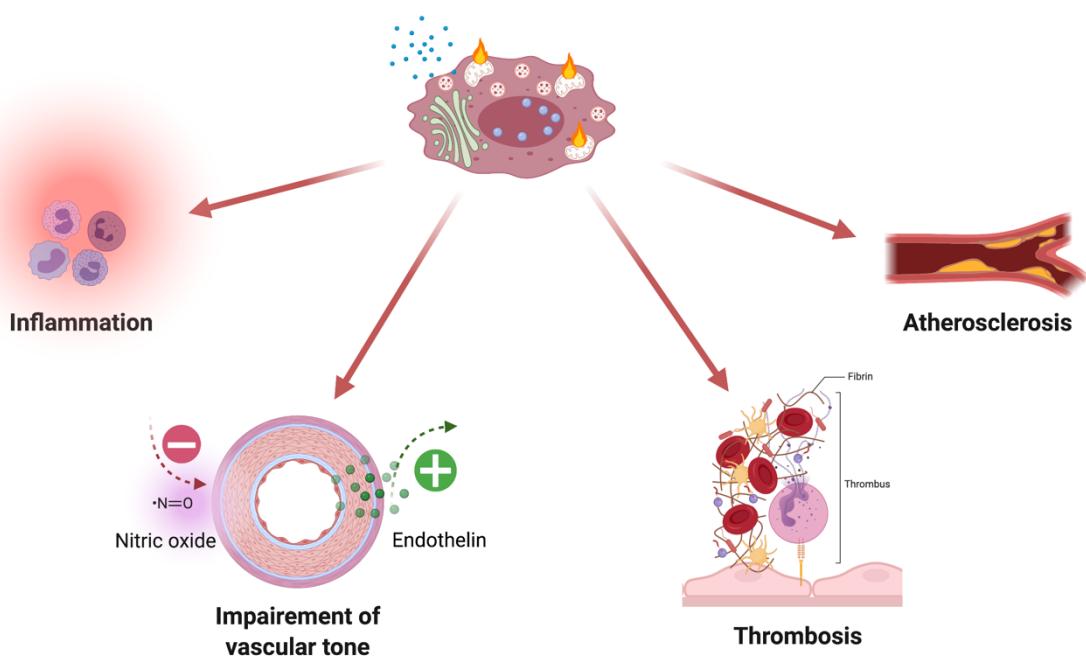


Figure 31 : Caractéristiques d'une cellule endothéliale sénescente dysfonctionnelle.

L'accumulation de cellules endothéliales sénescentes entrave l'homéostasie vasculaire. Les principales conséquences sont l'acquisition progressive d'un phénotype endothéial inflammatoire, procoagulant, proathérogène et la perte du tonus vasculaire avec une disponibilité réduite de NO et une libération accrue d'endothéline. (NO: Nitric oxide). **Réalisation personnelle.**

IV.G Quelles sont les voies menant à la sénescence cellulaire ?

L'une des principales découvertes du début du XXI^e siècle en biologie est qu'en plus de la sénescence réplicative, les cellules peuvent également subir une sénescence non planifiée lorsqu'elles sont soumises à des facteurs de stress. Ainsi, la SIPS et la sénescence réplicative partagent des voies qui se chevauchent avec des points de contrôle distincts.

Pour évoluer vers la sénescence, il existe deux voies principales, à savoir la **voie de réponse aux dommages de l'ADN** d'un côté et la **voie du locus INK4/ARF** de l'autre. Ces deux voies sont extrêmement intriquées et activent *in fine* la sénescence. Ces deux voies vont se rejoindre pour aboutir à l'hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) qui entraînera un arrêt du cycle cellulaire.

Bien que la sénescence réplicative semble emprunter de manière préférentielle la voie DDR, elle peut aussi y aboutir dans certaines conditions *via* la voie INK4/ARF. Concernant la SIPS, à ce jour, il semblerait que ce mécanisme puisse se faire en utilisant l'une ou l'autre des deux voies principales.

IV.G.1 La voie de réponse aux dommages de l'ADN

Chaque jour, les cellules sont soumises à des stress de grande variété, d'origine endogène ou exogène, pouvant aboutir jusqu'à 100 000 lésions quotidiennes (Ciccia & Elledge, 2010). Ces lésions sont habituellement prises en charge par un ensemble complexe de voies de signalisations, dont le but est la réparation de l'ADN, appelé « réponse aux dommages de l'ADN » ou *DNA Damage Response* (DDR) (Lord & Ashworth, 2012). La DDR est une cascade complexe d'événements qui s'articulent, de manière simplifiée, en trois temps (Figure 32) :

- La détection et l'identification des dommages avec des protéines « capteurs » comme PARP pour poly(ADP-ribose) polymerase 1.
- La signalisation avec des protéines comme la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), ATR (*ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related*) ou ATM dont le rôle est essentiel pour coordonner la réponse la plus appropriée, réparation de la cassure d'ADN ou destruction de la cellule si les dommages sont trop importants.
- La réparation avec des protéines effectrices, comme POLQ ou des protéines de la famille RAD, qui vont réparer de manière adéquate la molécule d'ADN (résection, réplication, insertion...).

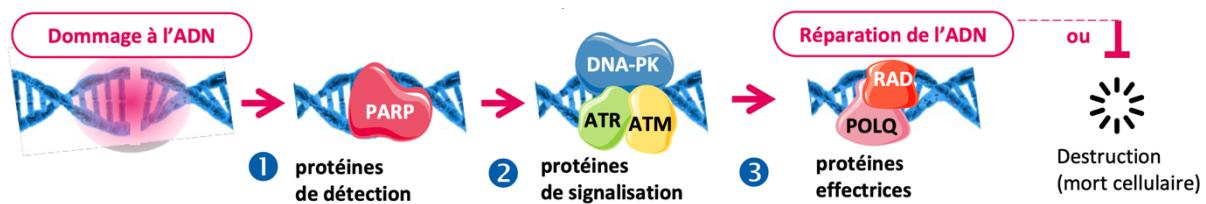


Figure 32 : Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR).
Issu de ONXEO, 2019.

La DDR est un élément majeur de la sénescence réplicative et de la SIPS (Figure 33). Dans la sénescence réplicative, les télomères, *via* le télosome (de Lange, 2005), également appelé "complexe shelterin", ont pour rôle d'empêcher la machinerie DDR de reconnaître les extrémités libres des chromosomes comme des cassures double-brin à réparer, une menace potentielle qui pourrait conduire à des événements de recombinaison ou de fusion chromosomique erronés (Childs et al., 2018). Lorsque les télomères deviennent dangereusement courts, le télosome protecteur n'est plus recruté par la voie DDR, ce qui favorise la sénescence.

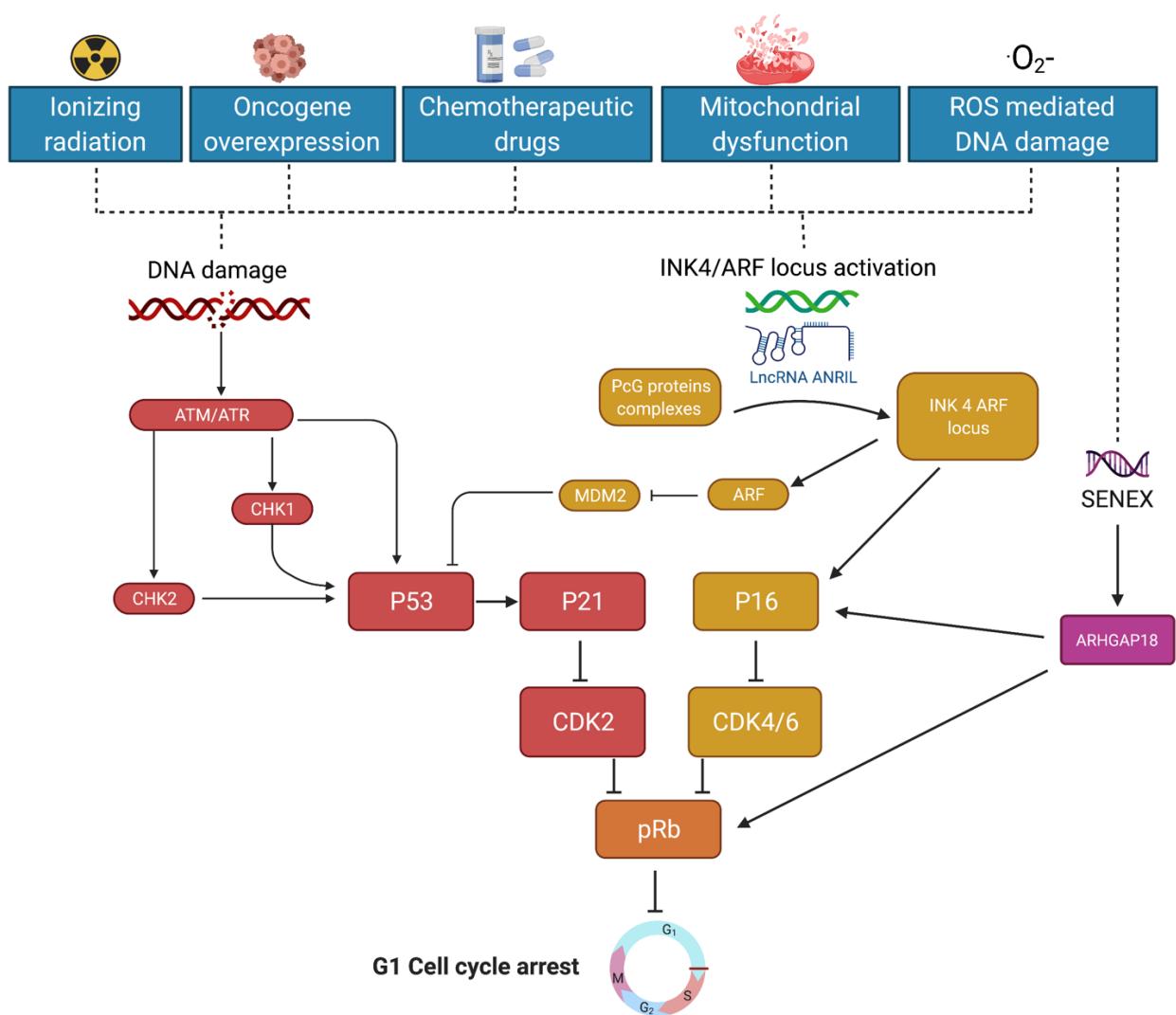


Figure 33 : Principales voies menant à la sénescence cellulaire.

Les mécanismes qui conduisent à la sénescence cellulaire comprennent l'activation directe de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) par la voie ATM/ATR et/ou du locus INK4a/ARF par

l'assemblage de complexes de protéines PcG éventuellement *via* l'ARN Lnc d'échafaudage ANRIL. La famille INK4, dont p16INK4a, fait partie des inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante ciblant CDK4/6. Enfin, les voies p53/p21 et p16/Rb sont des acteurs clés de la sénescence. (ANRIL: antisense non-coding RNA in the INK4 locus ; ARF: ADP ribosylation factor ; ARHGAP18 (Rho GTPase activating protein 18) ; ATM: Ataxia-telangiectasia mutated ; ATR: ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related ; CDKs: Cyclin-dependent kinases ; Chk1: checkpoint kinase 1; Chk2: checkpoint kinase 2 ; DDR: DNA damage response ; INK4: INhibitors of CDK4; p16/Rb: p16/Retinoblastoma protein ; PcG: polycomb ; Lnc RNA: long non-coding RNA ; ROS: reactive oxygen species). **Réalisation personnelle.**

La protéine p53 est le principal point de contrôle de la voie DDR. En effet, les lésions de l'ADN secondaires à différents types de stress vont activer la voie DDR. Cette voie passe par ATM/ATR qui vont activer p53 soit directement *via* la phosphorylation de la sérine 15, soit indirectement *via* l'activation de la checkpoint kinase 1 (Chk1) et de la checkpoint kinase 2 (Chk2). Chk1 et Chk2 étant deux protéines kinases spécifiques des sérines/thréonines qui phosphorylent p53 sur la sérine 20. ATM et ATR sont deux protéines de détection des dommages à l'ADN de la famille des phosphoinositide 3-kinases (PI3K) associées au syndrome de Louis-Bar, un trouble congénital neurodégénératif et immunodépresseur à fort risque de cancer (Amirifar et al., 2020).

En aval, p53 va induire la transcription de p21, une protéine inhibitrice de kinase cycline-dépendante (CDKi), qui bloque l'activité de CDK2, ce qui entraîne une hypophosphorylation de pRB. En conséquence, la pRB hypophosphorylée supprime l'expression des gènes de la phase S en se liant au facteur de transcription E2F, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (74).

IV.G.2 La voie du locus INK4/ARF

L'autre voie impliquée dans la sénescence, principalement déclenchée par des facteurs de stress, est contrôlée par le locus INK4/ARF situé sur le chromosome 9 en 9p21. Cette voie a été particulièrement étudiée dans la sénescence induite par les oncogènes ou *oncogene-induced senescence* (OIS) (Kim & Sharpless, 2006).

L'activation du locus INK4/ARF code pour des suppresseurs de tumeurs, notamment ARF (*ADP ribosylation factor*) et p16^{INK4a}, une CDKi. ARF est impliqué dans le contrôle de p53 mais aussi de p16^{INK4a}, un membre des inhibiteurs du cycle cellulaire INK4 qui se lie directement aux kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 qui vont bloquer la phosphorylation de pRB. A travers la voie du locus INK4/ARF, p53 peut aussi être activé mais cette fois *via* ARF une petite GTPase de la famille RAS, qui bloque l'activité de MDM2 une ubiquitine ligase qui conduit habituellement à la dégradation de p53. Une fois p53 activée, ceci aboutit à une augmentation de p21 comme pour la voie du DDR.

Les recherches en cours sur l'activation du locus INK4/ARF indiquent que la formation des complexes de protéines du groupe polycomb (PcG) (PRC 1 et PRC 2) sont les principaux initiateurs de cette voie. Les protéines PcG agissent comme des répresseurs de transcription par la triméthylation ou la mono-ubiquitination d'histones (H3 et H2A) permettant ainsi la modification de la chromatine au niveau de loci génétiques spécifiques impliqués dans l'expression de gènes contrôlant la réparation de l'ADN.

La manière dont le PcG est modifié au cours de la sénescence n'est pas encore complètement élucidée, mais des données récentes sur la différenciation cellulaire indiquent une implication possible du *silencing* de miARN (Guajardo et al., 2020). De manière frappante, dans divers modèles cellulaires de sénescence, le recrutement et le déplacement du PcG interagissant avec le locus INK4/ARF semblent également sous contrôle épigénétique par l'intermédiaire de longs ARN non codants (Lnc) servant d'échafaudages avec l'ADN, tels que ANRIL (*ARN non codant antisens dans le locus INK4*) (Kotake et al., 2011; LaPak & Burd, 2014; Yap et al., 2010).

IV.G.3 L'arrêt du cycle cellulaire

Finalement, que ce soit *via* la voie du DDR ou *via* le locus INK4/ARF, ces voies de la sénescence vont aboutir à une pRB hypophosphorylée qui va entraîner un arrêt du cycle cellulaire dépendant de E2F.

La progression du cycle cellulaire est permise par des facteurs de transcription qui dépendent en amont de kinases dépendantes des cyclines (Cdk). Pendant la phase G1, les Cdk

phosphorylent des substrats spécifiques comme pRb qui est l'un des principaux répresseurs de gènes impliqués dans la transition G1/S (Cobrinik, 2005). pRB exerce sa fonction en s'associant à des facteurs de transcription, principalement la famille des E2F et ainsi va les inhiber. La phosphorylation de pRb libère les complexes transcriptionnels E2F qui peuvent alors induire l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Inversement, lors des mécanismes de sénescence, en maintenant pRB hypophosphorylée, ce dernier reste complexé à E2F et inhibe ainsi la progression du cycle cellulaire.

De plus, une fois amorcée, l'amplification de la sénescence est renforcée par l'hétérochromatinisation des gènes du cycle cellulaire dans le SAHF (Aird & Zhang, 2013) et par la production, sous l'impulsion du SASP, de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 qui contribuent à maintenir l'arrêt du cycle cellulaire (Jin et al., 2014).

IV.G.4 Sénescence versus Apoptose ?

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée jouant un rôle clé dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses et endommagées, telles que les cellules précancéreuses ou infectées par un virus. Les cellules apoptotiques se caractérisent par la fragmentation de l'ADN, une altération de la membrane cytoplasmique, la formation de corps apoptotiques et l'activation d'enzymes protéolytiques telles que les caspases.

Les voies de l'apoptose et de la sénescence conduisent à des destins cellulaires alternatifs qui peuvent souvent être déclenchés par les mêmes facteurs de stress (Figure 34). En effet, une fois que les cellules entrent en sénescence, elles deviennent résistantes à l'apoptose extrinsèque et intrinsèque (Rochette & Brash, 2008; Sasaki et al., 2001; Wang, 1995). Cette résistance à l'apoptose extrinsèque des cellules sénescentes repose en partie sur une surexpression par ces cellules du decoy receptor 2 (DCR2) (Childs et al., 2017).

L'apoptose est un mécanisme qui dépend de l'activation de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques (BAX, PUMA, NOXA) et anti-apoptotiques de la famille du lymphome à cellules B 2 (BCL 2) (Rochette & Brash, 2008; Villunger et al., 2003). Des études récentes ont suggéré que la résistance à l'apoptose intrinsèque, est en partie due à l'augmentation des

membres de la famille BCL 2 (BCL 2, BCL XL et BCL-W) (Yosef et al., 2016) éventuellement régulée directement par p53 (un facteur de transcription impliqué dans les mécanismes d'autophagie, de DDR, de cycle cellulaire et d'apoptose) (Chipuk et al., 2004).

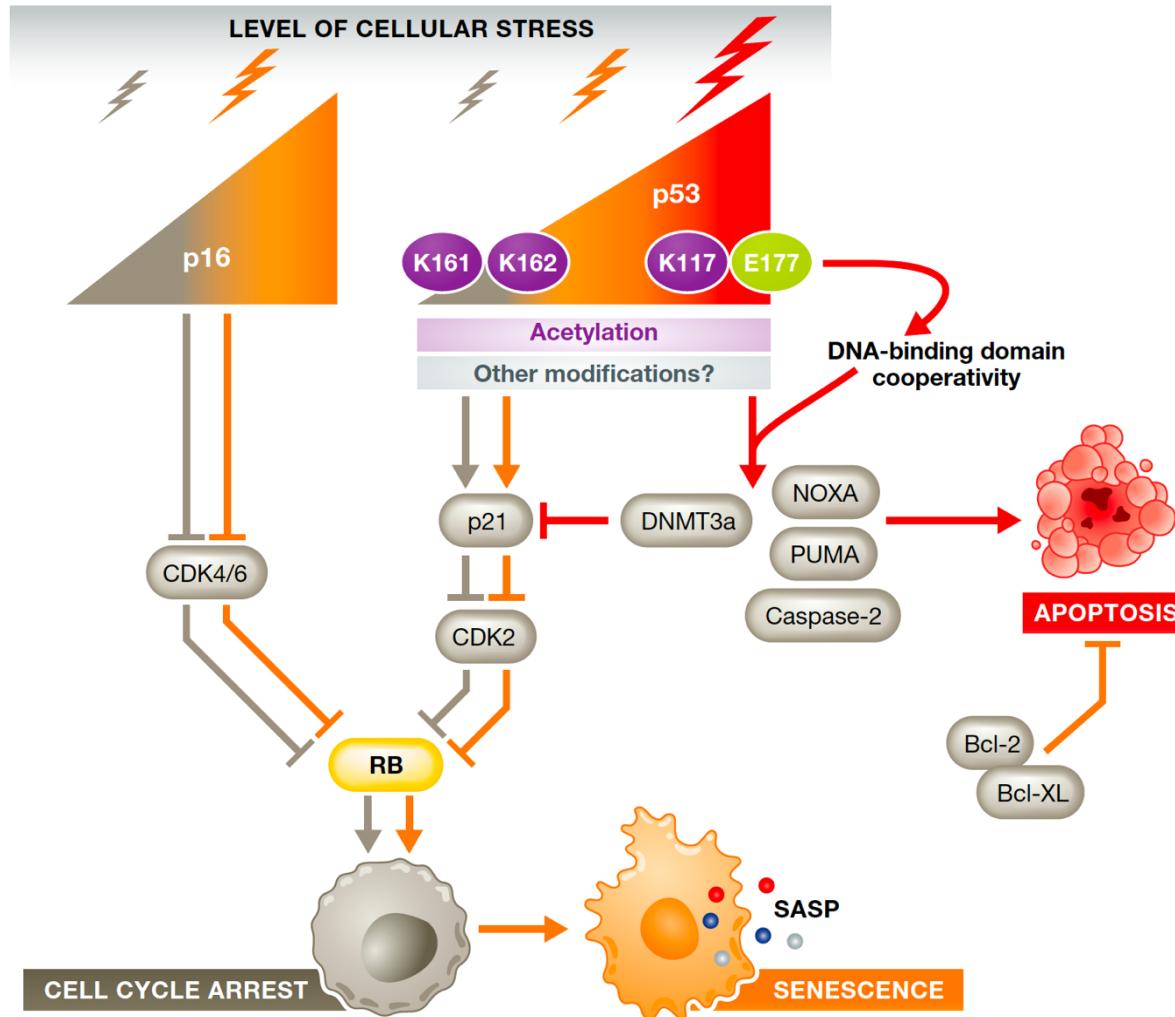


Figure 34 : Voies de signalisation orientant le choix entre l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose.

Les voies sont colorées de la manière suivante : celle conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en gris, celle conduisant à la sénescence en orange, et celle conduisant à l'apoptose en rouge. Le poids de la flèche reflète le niveau de stress. Les voies p16-Rb et p53-p21 sont connues pour leur importance dans la réponse cellulaire au stress. La décision d'activer p16, p53 voire les deux est déterminée par le niveau de stress ainsi que le type cellulaire. De faibles niveaux de p16 favorisent un arrêt transitoire, tandis que des niveaux élevés conduisent à la sénescence. De faibles niveaux de p53, avec une cinétique transitoire et une acétylation K161/K162, favorisent l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence. Des niveaux élevés de p53, l'acétylation K117 et la coopérativité des domaines de liaison à l'ADN au sein du tétramère p53 conduisent

à la transcription de gènes apoptotiques et à l'apoptose qui s'ensuit, à la fois directement et indirectement en bloquant des signaux pro-sénescence. **Issu de Childs et al., 2014.**

IV.H La sénescence prématuée induite par le stress (SIPS)

En 2000, l'observation originale de l'équipe d'Olivier Toussaint, à l'origine de la publication *princeps* sur la SIPS, était que des fibroblastes humains en culture entraient de manière robuste dans un état de sénescence plusieurs jours après une exposition répétée à un traitement léger au tert-butylhydroperoxyde conduisant à un stress oxydant sublétal (Dumont et al., 2000). Ces travaux ont ensuite été corroborés en cultivant des cellules mises en contact de manière soutenue ou répétée avec de nombreux facteurs de stress chimiques, comme le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol (Dumont et al., 2002), l'exposition chronique à des polluants (fumée de cigarette) ou l'irradiation (lumière UV-B) (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Comme vu précédemment, la SIPS est principalement initiée par des dommages à l'ADN, ces dommages pouvant activer la voie DDR, ou le locus INK4/ARF en l'absence de raccourcissement des télomères (Parrinello et al., 2003).

Cependant, bien que la SIPS se produise sans raccourcissement des télomères, ces derniers peuvent quand même être impliqués. Des données récentes ont d'ailleurs remis en question le concept selon lequel la SIPS est un processus indépendant des télomères. En effet, durant le stress à l'origine de la SIPS, les dommages à l'ADN concomitants se produisent de manière aléatoire sur l'ensemble du génome, y compris au niveau des télomères. Les cellules sénescentes conservent la capacité de réparer leurs dommages de l'ADN. Elles ne réparent cependant pas ceux qui se localisent dans des séquences répétées comme les télomères (Rossiello et al., 2014). Tandis que la plupart des dommages à l'ADN seront réparés dans les 24 heures, les régions télomériques resteront non réparées pendant des mois, maintenant ainsi un dommage à l'ADN non résolu (Hewitt et al., 2012). De manière intéressante, ceci révèle que les voies menant à la sénescence, qu'elle soit prématuée ou réplicative, peuvent à un moment donné partager des caractéristiques communes intrinsèques. Néanmoins, il a été mis en évidence dans plusieurs études que la sénescence réplicative in-vitro et la SIPS semble déclencher principalement p21, tandis que la sénescence induite par le stress par des

modulateurs épigénétiques tels que le butyrate de sodium ou l'OIS déclencherait plutôt p16 (Kumari & Jat, 2021).

Récemment, un gène induisant la sénescence dans les cellules endothéliales en réponse à une stimulation à l' H_2O_2 a été mis en évidence. Ce gène nommé SENEX induit la voie p16/Rb en augmentant à la fois l'ARNm de p16 et la protéine p16, tout en diminuant le niveau de la pRb hyperphosphorylée (Coleman et al., 2010). C'est par sérendipité que SENEX a été identifiée à partir d'un clone unique de cellules endothéliales dans un modèle de recherche sur la formation de tubes capillaires. Le profil d'expression de SENEX étant régulé à la baisse durant l'étape de formation de la lumière du tube capillaire mais régulé à la hausse par la suite. La séquence protéique codée par SENEX contient un domaine protéique RhoGAP putatif nommé ARHGAP18 (RefSeq NP_277050), le reste de la séquence protéique n'étant pas identifié. Cependant, l'inhibition de l'activité de RhoGAP ne modifie pas l'action de SENEX. Ainsi, les mécanismes d'action de ce gène et ses partenaires ne sont pas encore totalement compris. D'après la base de données Biogrid, les interactions potentielles comprendraient la protéine de liaison à l'ARN MPP6, un partenaire de la protéine de liaison à l'ARN polymérase II Che-1 impliquée dans le point de contrôle du cycle cellulaire (Bruno et al., 2006). Enfin, SENEX ne modifie pas l'expression de p53 ou p21 et n'affecte pas la longueur des télomères, ce qui indique une voie dominante de p16 (Figure 30).

IV.I Le sepsis comme facteur de stress induisant une sénescence prématuée

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études *in-vitro* et *in vivo* ont mis en évidence l'association entre sepsis et sénescence prématuée (Tableau 6 et 7), confirmant que le sepsis en lui-même, au même titre que certaines chimiothérapies ou des radiations ionisantes, était un facteur de stress pouvant être à l'origine d'une SIPS et déclencher une sénescence accélérée dans certains tissus.

In-vitro (Tableau 6), après une exposition unique au LPS durant 24 h, Kim *et al.* ont mis en évidence l'acquisition d'un phénotype de sénescence de cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires de type II en culture. Cette sénescence accélérée était mise en évidence après 7

jours, à travers une augmentation de l'activité SA- β -Gal, caractéristique de cellules sénescentes, mais sans diminution de la longueur des télomères (Kim et al., 2012). De manière intéressante, des études récentes rapportent également des preuves de sénescence induite lors de sepsis d'origine virale, aussi appelés VIS pour *virus-induced senescence*. Martinez et al. décrivent ainsi que le VRS provoque une forte activation de la réponse aux dommages de l'ADN, comme le montre la phosphorylation de la kinase ATM, l'augmentation de p53 et de son effecteur p21, ainsi que la présence de foyers nucléaires γ -H2AX sur des pneumocytes humains de type II (A549) et des cellules nasopharyngées (HEp-2) in-vitro. La cascade de ces événements moléculaires conduit à une augmentation de l'activité SA- β -Gal dans ces cellules et aussi l'acquisition d'un SASP (Martinez et al., 2016).

En stimulant de manière répétée les cellules de la microglie BV2 in-vitro avec du LPS, Yu et al. ont trouvé des signes de sénescence prématuée tels qu'une forte diminution de la prolifération cellulaire, un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1 mais surtout une augmentation de p53, de l'activité SA- β -Gal et des SAHF (Yu et al., 2012). D'autres études in-vitro ont montré des résultats similaires après une stimulation par LPS sur d'autres types cellulaires tels que les progéniteurs d'adipocytes (Zhao & Chen, 2015) ou les cellules souches de la pulpe dentaire (Feng et al., 2014).

In Vitro					
Cells	Species of origin	Sepsis model	Analysis time points	Results	References
• Microglia cells (BV2 Cell)	C57BL/6 mouse	10 ng/ml LPS stimulation: <ul style="list-style-type: none">• once• 3 times: once every 48 h for 4 h each• 6 times: once every 24 h for 4 h each	After 1, 6 or 12 days	Kinetics (6 to 12 days): <ul style="list-style-type: none">• Inhibition of cell proliferation• Elevated degree of:<ul style="list-style-type: none">◦ cell cycle arrest in the G0/G1 phase◦ the aging associated proteins p53◦ senescence-associated β-galactosidase activity◦ senescence-associated heterochromatic foci (SAHF)	Yu <i>et al.</i> , 2012
• Type II pulmonary alveolar epithelial cells (A549 immortalized cells)	Human	5 - 20 μ g/ml LPS single stimulation for 24h	After 1, 3 or 7 days	<ul style="list-style-type: none">• Elevated degree of:<ul style="list-style-type: none">◦ senescence-associated β-galactosidase activity• No decrease in telomere length	Kim <i>et al.</i> , 2012
• Dental pulp stem cells (DPSCs)	Human	10 ng/ml <i>Escherichia coli</i> LPS (serotype 0111:B4) stimulation: <ul style="list-style-type: none">• once for 6 h• 3 times: once every 48 h for 6 h each• 6 times: once every 24 h for 6 h each	After 1h	<ul style="list-style-type: none">• Senescence-like morphology• Inhibition of cell proliferation• Elevated degree of:<ul style="list-style-type: none">◦ cell cycle arrest in the G1 phase◦ senescence-associated β-galactosidase activity◦ the aging associated p16^{INK4A}◦ of p16^{INK4A} mRNA• Knockdown of p16^{INK4A} expression by siRNA transfection reversed the senescent features of LPS-treated DPSCs	Feng <i>et al.</i> , 2014
• Adipocyte progenitors (Stromal-vascular cells)	C57BL/6 mouse	0.2 μ g/ml LPS stimulation for 24 h	After 3 days	<ul style="list-style-type: none">• Elevated degree of:<ul style="list-style-type: none">◦ p53 phosphorylation◦ senescence-associated β-galactosidase activity◦ β-galactosidase-positive cells◦ mRNA indicating significant SAPS (TNFα, IL-1β, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and VEGFα)• No accelerate telomere shortening	Zhao <i>et al.</i> , 2015
• Type II pulmonary alveolar epithelial cells (A549 immortalized cells)	Human	Human respiratory syncytial virus (<i>Pneumovirus</i> genus of the <i>Paramixoviridae</i> family)	After 48h	<ul style="list-style-type: none">• Senescence-associated secretory phenotype (SASP) in supernatant• Elevated degree of:<ul style="list-style-type: none">◦ the aging associated proteins p53◦ senescence-associated β-galactosidase activity	Martinez <i>et al.</i> , 2016
• Human nasopharyngeal cells (HEp-2 immortalized cells)					
• Neuroblastoma Neuro2a Cells	Mouse	H7N9 <i>Influenza A</i> Virus	After 3 days	<ul style="list-style-type: none">• Senescent cells-like morphology• Increase senescence-associated β-galactosidase activity	Yan <i>et al.</i> , 2017

Tableau 5 : Études de la sénescence induite par le sepsis dans des modèles in-vitro
Réalisation personnelle.

A ce jour, peu d'études ont confirmé ces observations *in vivo* (Tableau 7). Oliveira *et al.* ont montré dans un modèle murin d'endotoxémie expérimentale, une réduction de près de 20 % de la longueur des télomères dans différents tissus 48h après injection intrapéritonéale de LPS, en utilisant une technique de *polymerase chain reaction* (PCR) quantitative. Cependant, aucun autre marqueur de sénescence n'était évalué (Oliveira *et al.*, 2017). Dans un autre modèle animal, Li *et al.* ont également démontré l'apparition d'une sénescence prématuée dans les poumons de souris dans un sepsis séquentiel, en deux temps. Dans ce modèle, les souris étaient soumises à une CLP dans un premier temps, suivie d'une infection pulmonaire sublétale à *Pseudomonas aeruginosa* par instillation intra-trachéale ensuite. En évaluant les

marqueurs de sénescence tels que l'activité SA- β -Gal et l'expression de p16 par western blot, les auteurs ont mis en évidence une sénescence accélérée dans le tissu pulmonaire des souris septiques (Li et al., 2018). Dans l'étude de Martinez *et al.* citée précédemment, en infectant des souris avec le VRS, les auteurs ont également mis en évidence une sénescence *in vivo*, dans l'épithélium des voies respiratoires (Martinez et al., 2016).

In Vivo					
Tissues	Species of origin	Sepsis inducer	Time of the analysis	Results	References
• Blood, spleen and kidney samples (unspecified cell type)	Young male balb/c mice	15 mg/kg LPS intraperitoneal injection	After 1h or 48h	<ul style="list-style-type: none"> Dose-dependent telomere shortening in the spleen and liver at 48h (but not at 1h) measured by quantitative polymerase chain reaction (PCR) No difference in telomerase expression in kidney homogenates 1h after LPS 	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
• Lung tissue (unspecified cell type)	Young male C57BL/6 mice	Two-hit mouse model using CLP followed by sublethal <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection 4 hours later.	24h after <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection	<ul style="list-style-type: none"> Up-regulation of: <ul style="list-style-type: none"> senescence-associated biomarker p16^{INK4a} senescence-associated β-galactosidase activity 	Li <i>et al.</i> , 2019

**Tableau 6 : Études de la sénescence induite par le sepsis dans des modèles *in vivo*.
Réalisation personnelle.**

IV.J Thérapies de nouvelles générations ciblant les cellules sénescentes : une solution contre les troubles cardiovasculaires post-sepsis ?

Ce qui relevait encore il y a peu de mythes ancestraux, comme celui de la fontaine de jouvence voire de science-fiction est en train de devenir une réalité scientifique. En effet, de nombreuses études récentes confirment une modulation possible de la sénescence (Baker et al., 2011; Xu et al., 2018). Ce nouveau champ de recherche émergeant que l'on nomme désormais la « sénothérapie » est un domaine en plein développement visant à mettre au point d'éventuels agents et stratégies thérapeutiques permettant de cibler spécifiquement la sénescence cellulaire.

Concernant les thérapeutiques, deux grandes classes émergent, à savoir les sénolytiques dont le but est l'élimination spécifique des cellules sénescentes ("sénolyse"). Et les sénostatiques dont le but est de tenter de limiter l'acquisition d'un phénotype de sénescence voire de l'inverser (Figure 35).

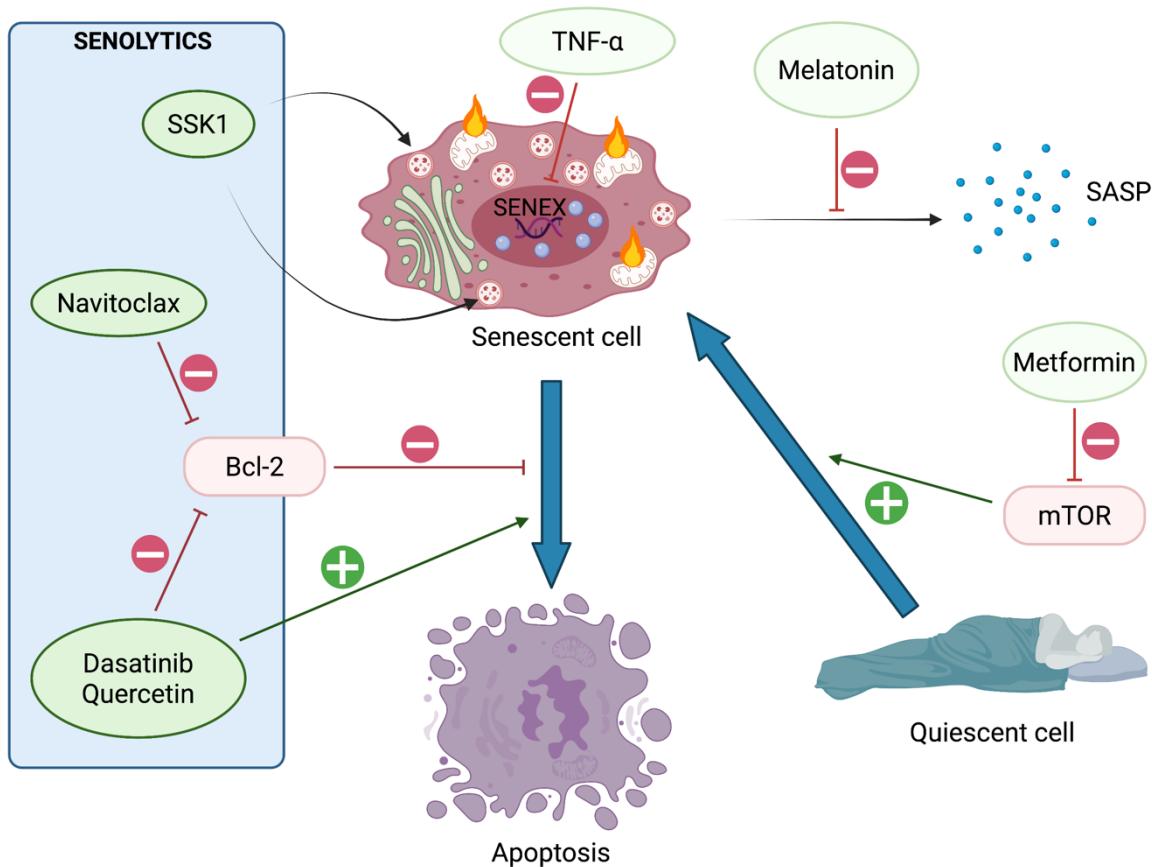


Figure 35 : Principales cibles des sénothérapies.

Les sénolytiques visant à éliminer les cellules sénescantes favorisent l'apoptose en aval ou ciblent directement les lysosomes sénescents (SSK1). Les sénostatiques empêchent l'acquisition d'un état sénescent en limitant la conversion des cellules quiescentes, l'acquisition progressive de SASP et l'inhibition de SENEX. (SASP: senescent-associated secretory phenotype ; SSK1: senescence-specific killing compound 1). **Réalisation personnelle.**

De nombreuses études pharmacologiques récentes mettent en évidence que l'utilisation de sénolytiques ou de sénostatiques pouvait contribuer à limiter et ralentir la sénescence (Baker et al., 2011; Xu et al., 2018). Au vu de l'implication de la sénescence dans les maladies cardio-vasculaires et plus précisément celles liées à l'athérosclérose, ces thérapies sont aujourd'hui considérées comme des thérapies de nouvelle génération extrêmement prometteuses (Childs et al., 2016; Dookun et al., 2020).

IV.J.1 Les sénolytiques

Dans une étude majeure de 2018, Kirkland et ses collègues de la Mayo Clinic ont apporté comme preuve de concept que les cellules sénescentes transplantées peuvent provoquer un handicap physique et une réduction de la durée de vie chez des souris jeunes et d'âge moyen (Xu et al., 2018). Ils ont également démontré que l'administration orale intermittente d'un cocktail de sénolytiques composé de dasatinib et de quercétine pouvait inverser l'effet des cellules sénescentes et augmenter de manière significative la durée de vie des souris. Dans la même étude, en administrant ce même cocktail de sénolytiques à des souris très âgées de 24-27 mois (équivalent à un âge de 75-90 ans chez l'homme), leur durée de vie médiane augmentait de 36 % par rapport au groupe contrôle.

À ce jour, une des principales stratégies sénolytiques consiste à forcer les cellules sénescentes à emprunter la voie de l'apoptose en inhibant les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Pignolo et al., 2020) qui sont habituellement surexprimées dans les cellules sénescentes (Baar et al., 2017).

Les sénolytiques les plus étudiés sont le dasatinib (un pan-inhibiteur de tyrosine kinases), la quercétine (un antioxydant et anti-inflammatoire de la classe des flavonoïdes présent dans de nombreux fruits et légumes et ciblant principalement la PI3-Kinase et les serpines) et le navitoclax précédemment nommé ABT263 (un mimétique du domaine BH-3 des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et Bcl-xL) (Chang et al., 2016; Hickson et al., 2019; Yosef et al., 2016). Le navitoclax semble prometteur dans la prévention des troubles cardiovasculaires potentiellement induits par le sepsis, puisqu'il a été démontré qu'il réduisait efficacement le poids, le nombre et la taille moyenne des plaques athéromateuses dans un modèle murin d'athérosclérose (*Ldlr*^{-/-}) présentant en plus une sénescence établie (Childs et al., 2016). De même, il a été démontré que le dasatinib et la quercétine empêchaient la dysfonction vasomotrice chez les souris âgées et réduisaient la charge de cellules sénescentes ainsi que la calcification des plaques athéromateuses dans un modèle murin d'athérosclérose *ApoE*^{-/-} exacerbé par un régime riche en graisses (Roos et al., 2016).

Alors que le ciblage de BCL-2 peut potentiellement entraîner de l'apoptose cellulaire indésirable dans des cellules non sénescentes et une toxicité (Carpenter et al., 2021), un

nouveau traitement sénolytique semble prometteur. La SSK1 pour *senescence-specific killing compound 1* permettrait de mieux cibler les cellules sénescentes avec un faible impact sur les cellules non sénescentes. En effet, cette prodrogue est spécifiquement clivée par l'activité lysosomale accrue de la β -galactosidase caractérisant les cellules sénescentes avant d'être transformée en gemcitabine cytotoxique induisant l'apoptose, comme cela a été démontré chez la souris et des cellules endothéliales humaines in-vitro (Cai et al., 2020).

Les résultats du premier essai clinique évaluant la tolérance et l'impact de sénolytiques chez l'homme ont été publié en 2019 sous la direction du même James L. Kirkland (Justice et al., 2019). Cette étude en ouvert, à bras unique, ne concernait pas des patients atteints de maladies cardio-vasculaires mais de fibrose pulmonaire idiopathique, pathologie dans laquelle la sénescence cellulaire joue un rôle néfaste majeur (Faner et al., 2012). Les patients traités recevaient un cocktail de dasatinib (100 mg/jour) et quercétine (500 mg deux fois par jour), trois jours par semaine durant 3 semaines. Cinq jours après la fin du traitement, les auteurs ont démontré pour la première fois une bonne tolérance des traitements mais aussi une amélioration significative de l'endurance à la marche, de la vitesse de marche, de la performance au test de lever de chaise et d'autres scores de performance physique.

Plus récemment, Kirkland et ses collègues ont démontré pour la première fois qu'un traitement de 3 jours, par les mêmes sénolytiques que précédemment et à la même posologie, réduisait le nombre de cellules sénescentes chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique sur néphropathie diabétique mais aussi la production du SASP (Hickson et al., 2019).

IV.J.2 Les sénostatiques

Bien que la sénolyse soit une stratégie pertinente, elle pourrait s'avérer délétère dans certains tissus à faible régénération.

Inhiber le SASP, *via* la mélanine par exemple (Yu et al., 2017), sans provoquer d'effets indésirables est un défi car de nombreuses voies susceptibles d'activer ce SASP (comme NF-

κB ou mTOR) sont également impliquées dans des processus critiques tels que la surveillance des tumeurs ou le système immunitaire (Chen et al., 2021).

De manière intéressante, SENEX est un gène sensible au TNF- α . Un traitement in-vitro par une faible concentration de TNF- α provoque la régulation négative de SENEX au niveau endothérial, ce qui entraîne l'apoptose, confirmant que SENEX est l'une des cibles prometteuses dans la prévention précoce de la sénescence endothéiale induite par le sepsis (Coleman et al., 2010).

Une autre stratégie de protection vasculaire serait de prévenir le passage de la quiescence endothéiale à la sénescence en inhibant la voie mTOR. La confirmation a été apportée chez des souris adultes ApoE-/- traitées par la metformine. Le traitement a permis d'inhiber la sénescence des cellules endothéliales et a ainsi contribué à une diminution partielle de la formation des plaques d'athérome (Karnewar et al., 2018).

IV.J.3 Thérapie de rajeunissement (rejuvenation therapy)

Une autre approche faisant partie du panel des sénothérapies est une stratégie de remplacement cellulaire en utilisant des cellules souches (Charo & Sipp, 2018). Dans un modèle murin de transplantation de cellules souches, des cellules souches de moelle osseuse Sca1+ provenant de jeunes souris ont été transplantées à des souris âgées. Ainsi, après un infarctus du myocarde, les cellules souches greffées ont favorisé un rajeunissement endothérial cardiaque précoce par le biais de la voie de domiciliation (*Homing*) des cellules souches Cxcl12/Cxcr4 (Li et al., 2019).

Hypothèses et objectifs

Le choc septique reste à ce jour une pathologie grevée d'une lourde mortalité et d'une importante morbidité. Longtemps la recherche s'est concentrée sur la phase aiguë du sepsis avant que des travaux plus récents ne mettent en lumière les conséquences néfastes à long terme de cette pathologie lors du syndrome post-sepsis. Deux complications tardives majeures émergent comme responsables d'une grande partie de la morbi-mortalité du syndrome post-sepsis, à savoir les complications cardio-vasculaires et infectieuses.

L'hypothèse du travail est l'implication de la sénescence dans la physiopathologie des complications cardio-vasculaires et infectieuses post-sepsis. Le choc septique du fait de l'agression par un pathogène mais aussi de la réaction hyperinflammatoire qui en découle serait à l'origine d'une sénescence cellulaire prématûrée induite par le stress vasculaire et surtout endothérial, mais aussi leucocytaire et surtout lymphocytaire.

Les objectifs étaient donc :

- Rechercher les processus précoces et tardifs de sénescence cellulaire endothéiale et leucocytaire liés au choc septique ;
- Évaluer l'impact de la sénescence endothéiale sur la survenue des évènements cardio-vasculaires après un choc septique ;
- Évaluer l'impact de la sénescence leucocytaire sur la survenue d'une nouvelle infection après un choc septique.

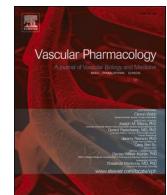
Ce manuscrit s'organise sur la présentation de résultats originaux de recherche expérimentale sur modèle cellulaire in-vitro, sur modèle animal chez le rat et de recherche clinique chez l'Homme, dans le cadre d'une approche translationnelle.

Mes travaux personnels ont conduit à des résultats tant in-vitro sur cellules stimulées que chez l'Homme. Les parties non soumises à publication seront déclinées sous la forme de matériels et méthodes puis de résultats. Mes travaux soumis à publications, en révision actuellement sont portés par un premier article qui montre pour la première fois, dans un modèle animal de péritonite la survenue d'une sénescence vasculaire faisant suite à un choc septique. Le deuxième article, revue de la littérature, se focalise sur la sénescence vasculaire et notamment endothéiale, comme potentiel chainon manquant, actuellement dans la

physiopathologie de l'athérogenèse accélérée à l'origine de complications cardio-vasculaires *de novo* chez les survivants à un choc septique.

Travaux personnels

Article publié dans la revue « Vascular Pharmacology » en décembre 2021.



Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: A new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications

Hamid Merdji ^{a,b}, Mohamad Kassem ^a, Louise Chomel ^a, Raphaël Clere-Jehl ^b, Julie Helms ^{a,b}, Kei Kurihara ^{a,c}, Ahmed Bey Chaker ^a, Cyril Auger ^a, Valérie Schini-Kerth ^a, Florence Toti ^a, Ferhat Meziani ^{a,b,*}

^a INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), CRBS (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg), FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), University of Strasbourg, Strasbourg, France

^b Department of Intensive Care (Service de Médecine Intensive - Réanimation), Nouvel Hôpital Civil, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Aichi Medical University, Department of Transplantation and Regenerative Medicine, Fujita Health University, School of Medicine, Aichi, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Septic shock
sepsis
Stress-induced premature senescence
Atherosclerosis

ABSTRACT

Background: Major adverse cardiovascular events among sepsis survivors is an emerging health issue. Because endothelial senescence leads to vascular dysfunction and atherosclerosis, sepsis could be associated to vascular stress-induced premature senescence and thus with long-term cardiovascular events.

Materials & methods: Adult Wistar male rats were submitted to cecal ligation and puncture, or a SHAM operation. Markers of inflammation, oxidative stress and endothelial senescence were assessed at 3, 7 and 90 days (D), and vascular reactivity was assessed in conductance and resistance vessels at D90. Expression of proteins involved in senescence and inflammation was assessed by Western blot analysis and confocal microscopy, oxidative stress by dihydroethidium probing.

Results: Pro-inflammatory endothelial ICAM-1 and VCAM-1 were up-regulated by three-fold in CLP vs. SHAM at D7 and remained elevated at D90. Oxidative stress followed a similar pattern but was detected in the whole vascular wall. Sepsis accelerated premature senescence in aorta vascular tissue as shown by the significant up-regulation of p53 and down-stream p21 and p16 senescent markers at D7, values peaking at D90 whereas the absence of significant variation in activated caspase-3 confirmed p53 as a prime inducer of senescence. In addition, p53 was mainly expressed in the endothelium. Sepsis-induced long-term vascular dysfunction was confirmed in aorta and main mesenteric artery, with a major alteration of the endothelial-dependent nitric oxide pathway.

Conclusions: Septic shock-induced long-term vascular dysfunction is associated with endothelial and vascular senescence. Our model could prove useful for investigating senotherapies aiming at reducing long-term cardiovascular consequences of septic shock.

Nonstandard abbreviations

(continued)

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
ICU	intensive care unit
EC	endothelial cell
MACEs	major adverse cardiac events
SIPS	stress-induced premature senescence
TF	transcription factor
SASP	senescence-associated secretory phenotype

(continued on next column)

CLP	cecal ligation and puncture
PE	phenylephrine
Ach	acetylcholine
PBS	phosphate buffer saline
ROS	reactive oxygen species
NO	nitric oxide
WB	western blot

* Corresponding author at: Service de Médecine Intensive- Réanimation – Nouvel Hôpital Civil, 1, place de l'Hôpital, F-67091 Strasbourg, Cedex, France.
E-mail address: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr (F. Meziani).

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>

Received 26 May 2021; Received in revised form 16 September 2021; Accepted 23 September 2021

Available online 27 September 2021

1537-1891/© 2021 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Sepptic shock is a life-threatening multiple organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection characterized by a systemic inflammatory response syndrome (SIRS), altering cardiovascular function (1) and is recognized as global health priorities by the World Health Organization (2). Although a precise estimate of the global epidemiological burden of sepsis is difficult to ascertain, sepsis was recently reported to affect worldwide 49 million people and cause 11 million deaths every year (3). In intensive care unit (ICU), sepsis is also the leading cause of mortality (4). However, long-term survival has improved, with approximately 14 million sepsis survivors each year (5) but generating a significant healthcare burden with adverse outcomes (6).

Sepptic shock is characterized by an endothelial cell (EC) dysfunction, affecting vascular tone and barrier's role (7), favoring systemic inflammation and coagulation activation (8) and multiple organ dysfunction. Vascular endothelium is critically involved in vascular homeostasis, including angiogenesis, blood pressure regulation, coagulation (9). Sepsis has been associated with acute and/or higher rates of cardiovascular complications linked to endothelial dysfunction, including atherothrombosis, ischemic stroke, hypertension and thrombotic events (10). The incidence of long-term cardiovascular diseases in post sepsis survivors is an emerging health issue, as indicated by recent propensity matched studies underlying an increased risk of major adverse cardiac events (MACEs) such as myocardial infarction and stroke (11). Indeed, an increased risk of mild- to long-term mortality among sepsis survivors is possibly related to an elevated rate of post-sepsis cardiovascular events as atherosclerosis (12,13) with yet non elucidated mechanisms.

During ageing, replicative senescence occurs as a result of telomere shortening. However, senescence can also be induced in young cells exposed to exogenous stressors, phenomenon identified as Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) (14). In senescent cells, the transcription factor (TF) p53 is an upstream initiator (15), whereas downstream other TF as p21 and p16 inhibit the progression of the cell cycle (16). Thus, endothelial cell senescence is characterized by an irreversible cell cycle arrest and a characteristic secretion profile termed senescence-associated secretory phenotype (SASP), including growth factors, proteases, and cytokines acting as potent autocrine and paracrine effectors affecting neighbor cells (17,18). Senescent ECs lining the vulnerable atherosclerotic plaques have been observed in human coronary arteries and aortic arches of elderly patients (19). However, to date and to the best of our knowledge, the premature or accelerated

endothelial senescence are not assessed *in vivo* during septic shock.

We therefore hypothesized that septic shock syndrome may favor premature and sustained EC senescence, which in turn promotes long-term atherothrombosis. For this purpose, we established an original three months sepsis rat model to investigate vascular markers of inflammation and senescence as well as endothelial dysfunction.

2. Material and methods

2.1. Study overview

We assessed long-term effects of sepsis on clinical parameters, systemic inflammation and atherothrombosis in young male Wistar rats without preexisting cardiovascular disease. Rats were submitted to cecal ligation and puncture (CLP), the “gold standard” model of sepsis in animals (20). Rats were randomly assigned to the CLP or SHAM subset and kept in the animal facility up to 3 months. Rats were sacrificed at selected time points (3, 7, 90 days) to assess lactate plasma concentration, glycemia, blood pressure, body weight, the degree of endothelial senescence, the aorta vascular tone and vascular markers of oxidative stress (Fig. 1).

2.2. Ethics statement

Male Wistar rats (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature controlled (22 °C) room and maintained on a standard 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 am), with free access to food and water. All aspects of this study complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication 85-23 (revised 1996)) and were approved by the French Ministry of Higher Education and Research and by a local Ethic Committee (Comité d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg, authorization number 15498). All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E 67-218-26).

2.3. Sepsis induction

Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP), a polymicrobial model of sepsis, previously described by Rittirsch et al. (21). Rats (mean weight 332 ± 30 g) were randomly assigned to either a SHAM group or CLP group and operated as described below. During surgical procedures, rats were anesthetized with isoflurane 1–2% (Piramal Critical Care, Pennsylvania, USA) and analgesia was performed

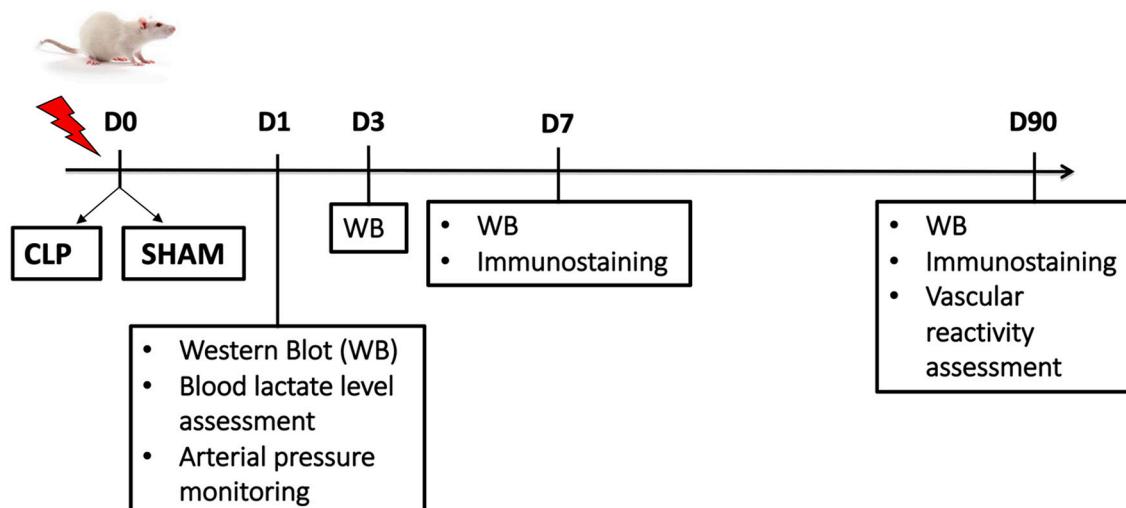


Fig. 1. Time scale of the experimental protocol.

with subcutaneous buprenorphine 0.01 mg/kg of body weight (CEVA, Libourne, France). A subcutaneous injection of 2 mg/kg lidocaine 1% (MSD Santé Animale, New-Jersey, USA) was performed before skin incision. Under aseptic conditions, a 1.5 cm midline laparotomy was performed to allow exposure, ligation and puncture of the caecum with a 21-gauge needle. A small amount of feces was extruded, the caecum returned into the peritoneal cavity and the incision was closed using two layers of sutures. SHAM rats underwent a midline laparotomy and cecal exposure without further manipulation. All rats received a subcutaneous injection of 0.9% NaCl (5–10 ml/kg of body weight) for fluid loss immediately after the surgery. In addition, a subcutaneous injection of buprenorphine 0.01 mg/kg was done each 6 h during 2 days. Rats had free access to standard chow and water after induction of sepsis. Three days (D3), seven days (D7) or three months (D90) after surgery, rats were sacrificed after being anesthetized with isoflurane, and whole blood collected through cardiac puncture. All rats that reached D90 were weighted (mean weight 497 ± 23 g).

2.4. Characterization of the sepsis degree of severity

Blood lactate levels were measured as a surrogate marker of severity 1 h and 24 h after the experimental procedure (H1, H24). Blood pressure was measured 24 h after the end of the procedure using a femoral intra-arterial line performed under anesthesia by isoflurane.

2.5. Isolation of rat aortic tissue

Aortas (3–5 cm) were harvested at day 90 (D90). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane. A median sternotomy was performed, and aorta were carefully excised and cut into 0.5 cm segments for histological and biochemical analysis. Segments from the aortic cross, the thoracic and abdominal aorta were either included into OCT (frozen section compound) or directly flash frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C for later use.

2.6. Assessment of inflammation and senescence markers by Western blot

Proteins were extracted from the aortic tissue after grinding using liquid nitrogen by RIPA lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na3VO4, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.01 mM okadaic acid, 20 mM, a tablet of protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland), and 1% Triton X-100 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Proteins (20 µg) were separated by 10% or 12% SDS-PAGE at 100 V for 2 h and further electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) at 100 V for 2 h. Membrane non-specific binding sites were blocked in Tris-buffered saline (TBS) solution containing 5% BSA (Bovine Serum Albumin) and 0.1% Tween-20 (Euromedex) for 1 h at room temperature. Proteins of interest were probed with specific primary antibodies in blocking solution, rabbit monoclonal anti-VCAM-1 (ab215380, 1:1000, Abcam, UK), mouse monoclonal anti-ICAM-1 (ab171123, 1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-COX-2 (ab15191, 1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-Cleaved Caspase 3 (9661 L, 1:1000, Cell signaling, USA), mouse monoclonal anti-p21 (sc-817, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA) and rabbit polyclonal anti-p53 (sc-6243, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA) and rabbit polyclonal anti-p16 (250,804, 1:500, Abbiotec, USA) at 4 °C overnight.

Membranes were washed three times with TBS-T (TBS-Tween, Euromedex) and incubated with peroxidase-labeled secondary antibodies; anti-rabbit (7074 s, 3:10000, Cell signaling technology, USA) or anti-mouse (7076 s, 1:10000, Cell signaling technology, USA) for 60 min, at room temperature. Immunostaining was revealed by chemiluminescence solution (ECL, Bio-Rad laboratories, USA). The chemiluminescence signal was recorded with ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) and analyzed using ImageQuant TL software (version 8.1, GE Healthcare).

Quantitative normalization with respect to β-tubulin as the house-keeping protein was performed for each protein of interest using a specific antibody (mouse monoclonal anti-beta-tubulin I T7816, Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

2.7. Vascular reactivity

ex vivo vascular reactivity of aorta and main mesenteric artery rings was assessed as previously described (22). Briefly, the aorta or the main mesenteric artery were cleaned of connective tissue, cut into rings (2–3 mm in length) and suspended in organ baths containing oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, MgSO₄ 1.18 mM, CaCl₂ 1.25 mM, NaHCO₃ 25 mM, D-glucose 11 mM, pH 7.4, at 37 °C) for the determination of changes in isometric tension. After equilibration and functional tests, rings were pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before construction of concentration-relaxation curves to acetylcholine (ACh). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 30 min before contraction with PE. Relaxations were expressed as percentage of the contraction induced by PE (23).

2.8. Immunofluorescence staining and confocal microscopy

Freshly dissected aorta abdominal segments were frozen with frozen section compound, cut to 14 µm section and fixed in paraformaldehyde 4% (or with Acetone: Alcohol, 50:50 mixture for anti-p53 antibody) during 30 min at room temperature before three washes in Phosphate buffer saline (PBS). Blocking of nonspecific binding sites was done in PBS containing 1% PFA and 0.1% Triton for 30 min before overnight incubation at 4 °C with either a mouse monoclonal antibody to p53 (sc-6243, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Germany), eNOS (610,297, 1:100; BD Bioscience, USA), iNOS (610,329, 1:200; BD Bioscience, USA) or a polyclonal rabbit antibody to MMP-9, (ab38898, 1:200; Abcam, UK). After three washes, tissue sections were incubated in the dark for 1 h at room temperature with the respective secondary antibodies: Alexa fluor-633-labeled anti-mouse IgG (A21052, 1:400, Life Technologies, USA) or Alexa fluor-633-labeled anti-rabbit IgG (A21071, 1:400, Life Technologies, USA). After three washes, slides were counterstained with DAPI before being mounted under coverslip using fluorescence mounting medium (DAKO, USA), dried in the dark and analyzed.

2.9. Determination of the vascular level of reactive oxygen species

The level of oxidative stress in tissues was determined using Dihydrorhodamine (DHE), a redox-sensitive fluorescent probe. After incubation of the tissues with a pharmacological inhibitor for 30 min, reactive oxygen species (ROS) sources were identified using 2.5 µM DHE, a redox-sensitive fluorescent probe incubated for 30 min, at 37 °C in a light protected humidified chamber. The nuclei were counterstained by DAPI labelling. After washings three time with PBS, slides were mounted under coverslip using fluorescence mounting medium (DAKO, USA), dried in dark and analyzed by confocal microscopy (Leica SP2 UV DM IRBE; Leica, Heidelberg, Germany). Fluorescence signal were quantified by Image J software after elimination of the autofluorescence signal.

2.10. Statistical analysis

Data, expressed as mean ± standard deviation (S.D.), were analyzed using GraphPad Prism8® (GraphPad Software, Inc., CA, US). “n” represents the number of animals. Mean values were compared using unpaired Student’s *t*-test for the comparisons of two groups for quantitative confocal microscopy results and western blot analysis. Statistical variance between different groups was determined by applying Two-way analysis of variance (ANOVA) test for vascular reactivity studies. Survival curves were analyzed by the log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. A *p* value < 0.05 was considered statistically

significant. All measurements were from at least three separate individuals.

3. Results

3.1. Septic shock induced arterial inflammation: A long-lasting effect

Twenty-four hours after CLP, a significant drop in the mean arterial pressure (MAP) was observed (CLP: 77.3 ± 6.8 vs. SHAM: 99.9 ± 2.3 mmHg, $p < 0.01$) Blood lactate concentration was accordingly significantly higher in CLP compared to SHAM (3.2 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.06 mM; $p < 0.01$) indicating tissue hypoperfusion and cellular hypoxia (24). Mortality only occurred in the CLP group and only during the first few days after surgery (Supplementary Data, Table A and Fig. A). Altogether, data confirmed a 24 h induced septic shock as previously described (25). Because ROS production was reported to promote senescence (26), we assessed ROS in the thoracic aorta wall. At D7, a 2-fold ROS increase was measured (CLP: 1759 ± 175.2 A.U., vs. SHAM: 844.3 ± 49.9 A.U.) the elevation being only 54% after 3 months (Fig. 2A). The ROS source was mainly the cell nucleus as confirmed by counterstaining with DAPI.

Similar data were found in the abdominal aorta.

Nevertheless, the expression of MMP-9, a matrix metalloproteinase associated with inflammation and senescence (27), was barely detectable in abdominal aorta from both CLP and SHAM animals at D7 by immunostaining but was drastically increased by 5 times in CLP at D90, as demonstrated by confocal microscopy (16.6 ± 2.7 vs. 91.1 ± 17.2 , $p < 0.05$) (Fig. 2B). Furthermore, the MMP-9 expression was mainly detected in the endothelium. While the expression of VCAM-1 and ICAM-1 was similar between CLP and SHAM at D3 in the abdominal or cross aorta (Supplementary data, Fig. B.1 and B2), sepsis induced a respective three-fold and two-fold significant up-regulation of VCAM-1 and ICAM-1 in the CLP subset compared to SHAM at D7 ($p < 0.05$) (Fig. 2C and D), values remaining elevated at D90 at least in the investigated thoracic aorta.

3.2. Sepsis induced premature senescence

While no marker of senescence could be detected in the abdominal aortic wall at D3 post peritonitis (Supplementary data, Fig. B.3, B.4 and B.5), the expression of p53, the upstream protein of the senescence

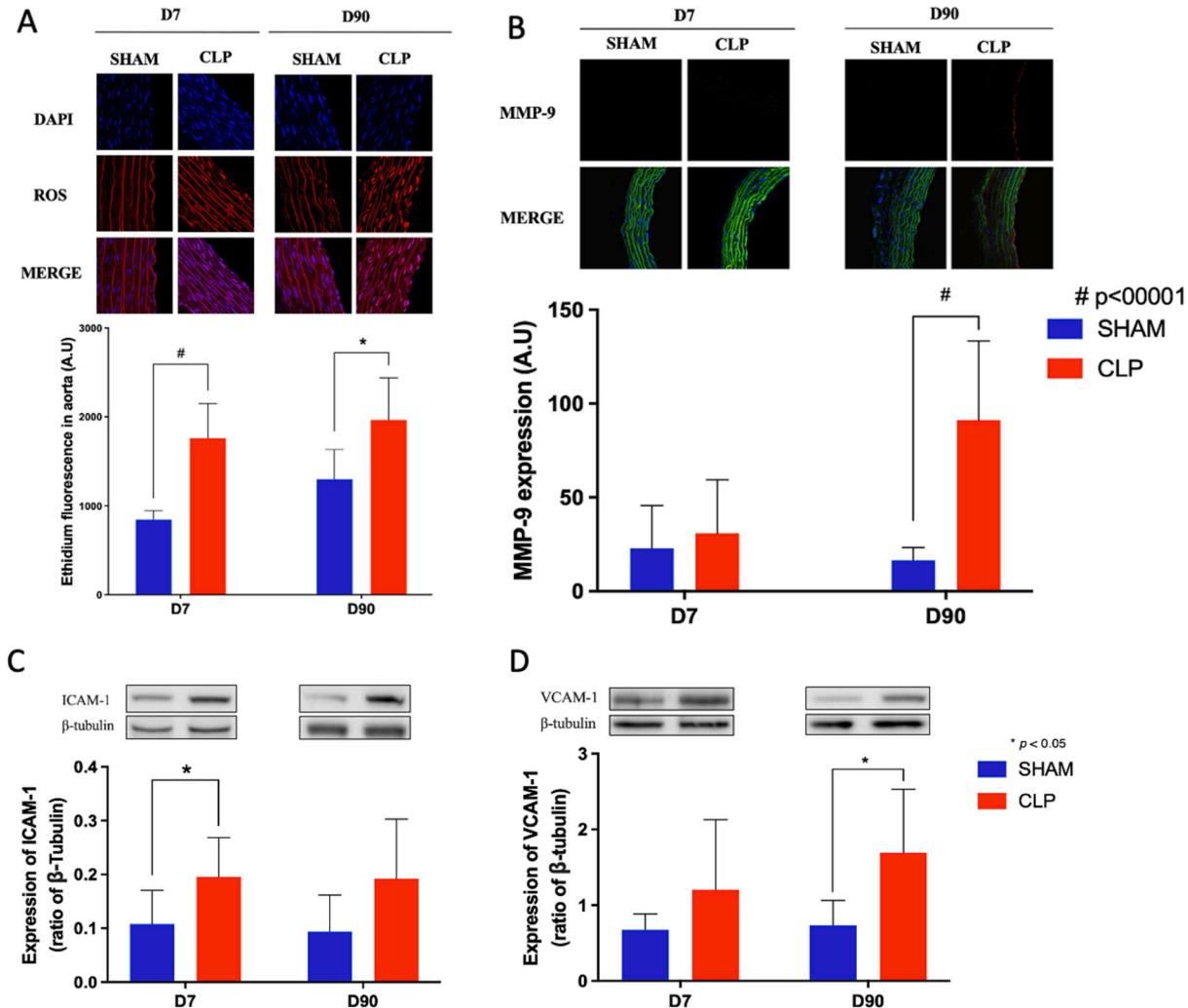


Fig. 2. 2A: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of ROS in aorta rings at D7 and D90. ROS were labeled in aorta rings by DHE probing (red) at D7 ($p = 0.02$) and D90 ($p = 0.03$). Sections were counterstained with DAPI to identify the nucleus. Endothelium is facing the right part of each quadrant. 2B: Sepsis induces a persistent endothelial up-regulation of MMP-9 in abdominal aorta rings at D7 ($p = 0.22$) and D90 ($p = 0.01$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. 2C: Sepsis induces a persistent up-regulation of ICAM-1 expression in aorta extracts at D7 ($p = 0.04$) and D90 ($p = 0.06$). 2D: Sepsis induces a persistent up-regulation of VCAM-1 expression in aorta extracts at D7 ($p = 0.19$) and D90 ($p = 0.01$). Data are expressed as mean and standard deviation (SD). D7: SHAM $n = 6$; CLP $n = 7$ and D90: SHAM $n = 11$; CLP $n = 8$. Unpaired Student's *t*-test was applied. * $p < 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pathway also associated with apoptosis, and of downstream p21 and p16 was enhanced by respectively 3 folds, 10 folds and 4 folds measured by western blot analysis at D7 ($p < 0.05$; Fig. 3A-B-D). Up-regulation of all senescence markers persisted after 3 months (Fig. 3A-C-D). The 3-fold elevation in p53, remained stable between D7 and D90, in accordance with the absence of any caspase-3 activation in SHAM or CLP group, thereby excluding apoptosis (Fig. 3E). Interestingly, at D90, p21 was only elevated by 5 folds, and the downstream p16 by 3.6 folds, pointing at a senescence-driven pathway, still operating after 3 months, although at a lower range. Moreover, the 3-fold increase in p53 expression was also measured by fluorescence microscopy in the endothelium of the aorta of CLP rats compared to SHAM at D7, a 2.5 enhancement being still observed after 3 months (Fig. 3F).

3.3. Septic shock is associated to long-term impairment of vascular reactivity

In the thoracic aorta, three months after peritonitis induction, a 50% reduction of the maximal contractile response to PE (Fig. 4A) and a 30% reduction in ACH-induced relaxation was observed in CLP group (Fig. 4B) with a maximal relaxation at 85% (vs. SHAM 55%, $p < 0.05$) (Fig. 4B). After indomethacin or L-NA adjunction, the contractile response of CLP aorta was similar compared to untreated SHAM rings (Supplementary data, Figure C.1 and C.2). In the thoracic aorta rings,

indomethacin adjunction, a non-selective inhibitor of cyclooxygenases, did not significantly alter the difference between CLP and SHAM Ach-induced relaxation (Supplementary data, Figure D.1). The eNOS inhibitor L-NA abolished the relaxation to ACh, thereby confirming a major role of nitric oxide (NO) (Supplementary data, Figure D.2).

Altogether, the endothelial dysfunction of the aorta rings 3 months after septic shock was mainly characterized by a blunted NO-component relaxation. In accordance, the aorta protein extracts showed a 40% reduction of eNOS expression occurring in CLP rats as early as D7 and persisting at D90, that was found restricted to the endothelial lining by fluorescence microscopy (Fig. 5). No significative difference was found, however, when comparing iNOS expression in both group at D7 and at D90 (Fig. 6).

In the main mesenteric artery, three months after peritonitis induction, a 50% reduction of the maximal contractile response to PE (Fig. 4C) was observed, however Ach-induced endothelial relaxation remained similar between CLP and SHAM with a maximal relaxation of 80% (Fig. 4D). Inhibition of COX by indomethacin and of the endothelium-derived hyperpolarization (EDH)-mediated relaxation in the presence of UCL-1684 plus TRAM-34 (10 μ M each) revealed a reduction in Ach-induced relaxation down-to 45% maximal relaxation, that was only evidenced in CLP (Supplementary data, Fig. E.1), thereby confirming a blunted NO pathway 90 days after peritonitis. However, adjunction of indomethacin plus L-NA combination indicated a slightly lower (EDH)-

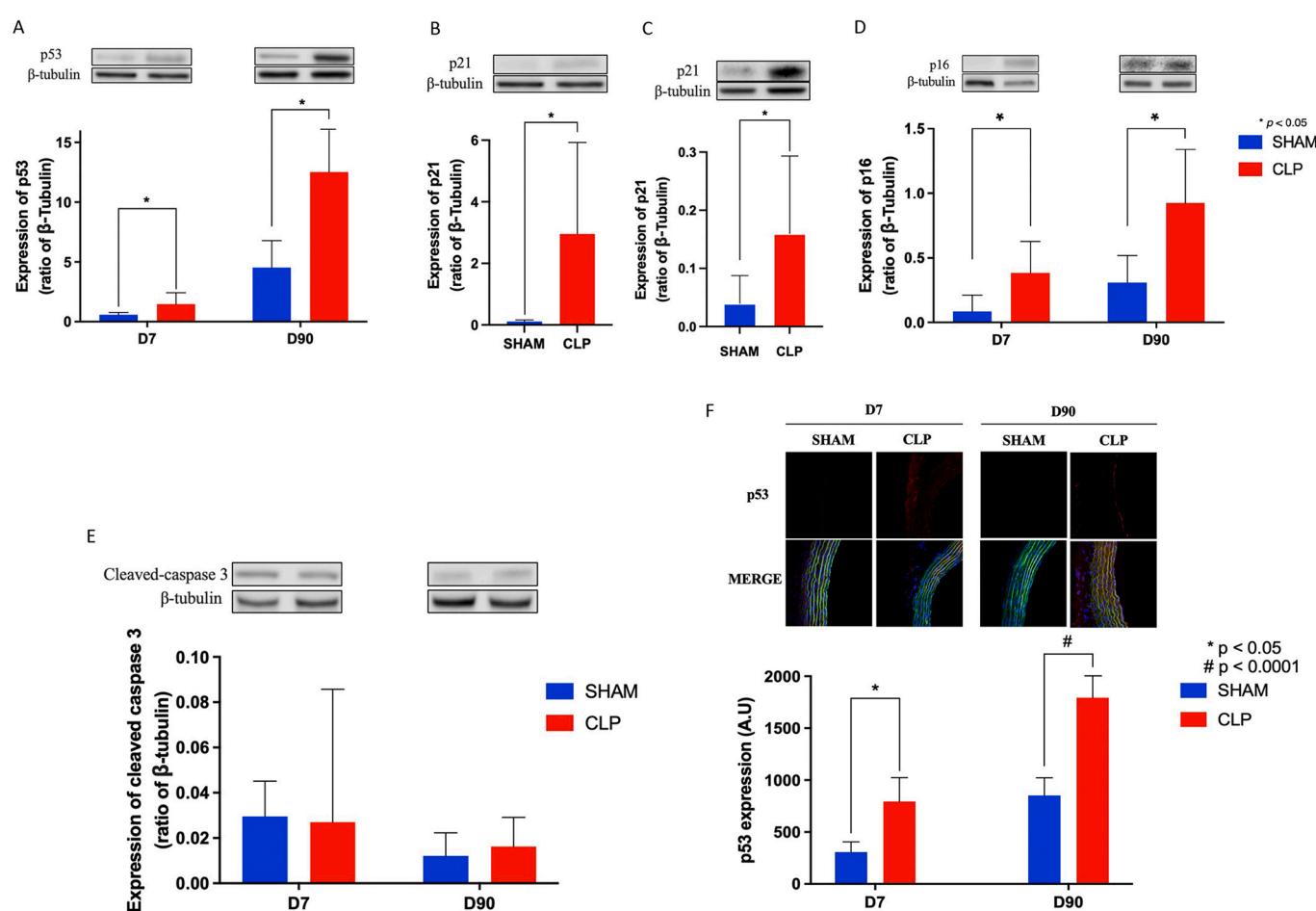


Fig. 3. 3A: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p53 in aorta extracts at D7 ($p = 0.01$) and D90 ($p = 0.04$). 3B and 3C: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p21 in aorta extracts at D7 (3B) ($p = 0.03$) and D90 (3C) ($p = 0.04$). 3D: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p16 in aorta extracts at D7 ($p = 0.01$) and D90 ($p = 0.004$). 3E: Caspase 3 expression in aorta extracts was measured at D7 ($p = 0.09$) and D90 ($p = 0.1$). 3F: Sepsis induces a persistent endothelial up-regulation of p53 in abdominal aorta rings at D7 ($p = 0.02$) and D90 ($p = 0.001$). Data are expressed as mean and standard deviation (SD). D7: SHAM n = 6; CLP n = 7 and D90: SHAM n = 11; CLP n = 8. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$. Endothelium is facing the right part of each quadrant.

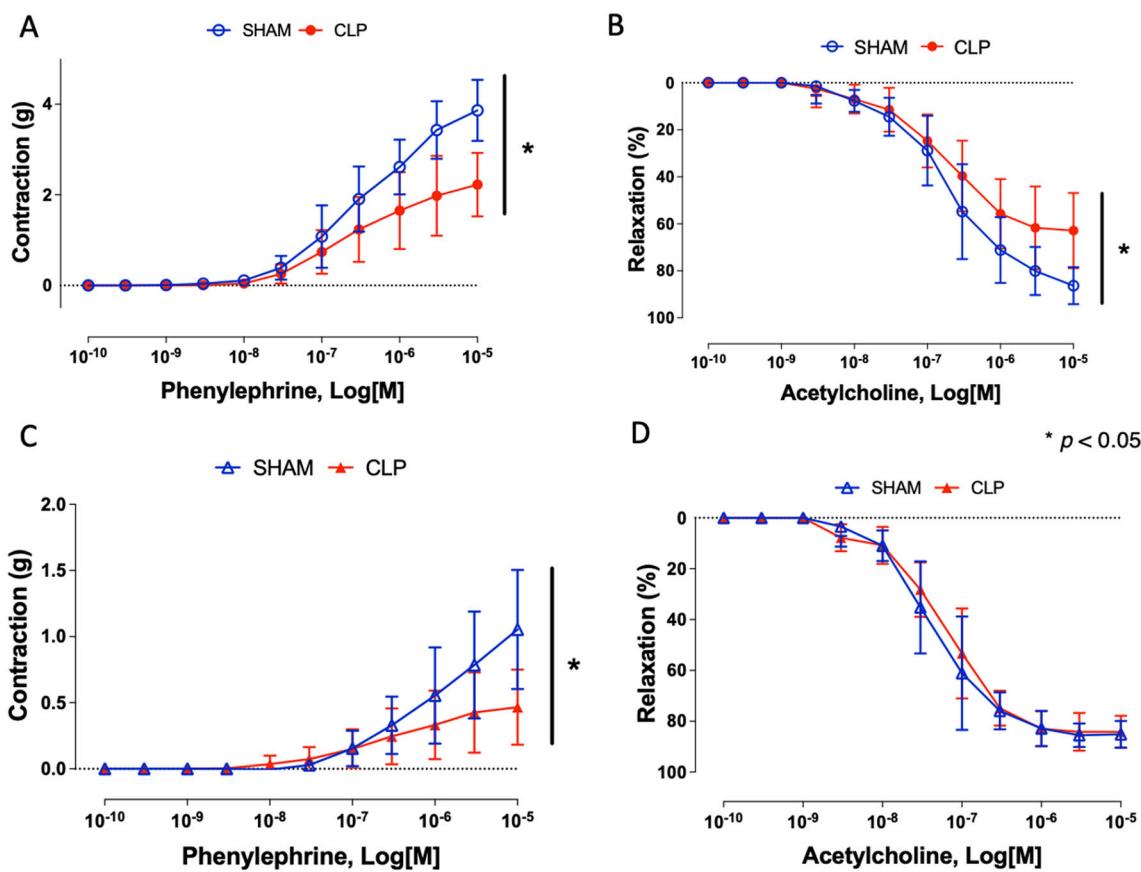


Fig. 4. Effect of sepsis on the endothelium-dependent contractile response to phenylephrine (4A) ($p < 0.0001$) and the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (4B) on aorta rings at D90 ($p = 0.01$). Effect of sepsis on the endothelium-dependent contractile response to phenylephrine (4C) ($p = 0.0001$) and the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (4D) on main mesenteric artery rings at D90 ($p > 0.9$). Values are shown as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 5$; CLP $n = 7$. Two-way ANOVA test was applied. * $p < 0.05$.

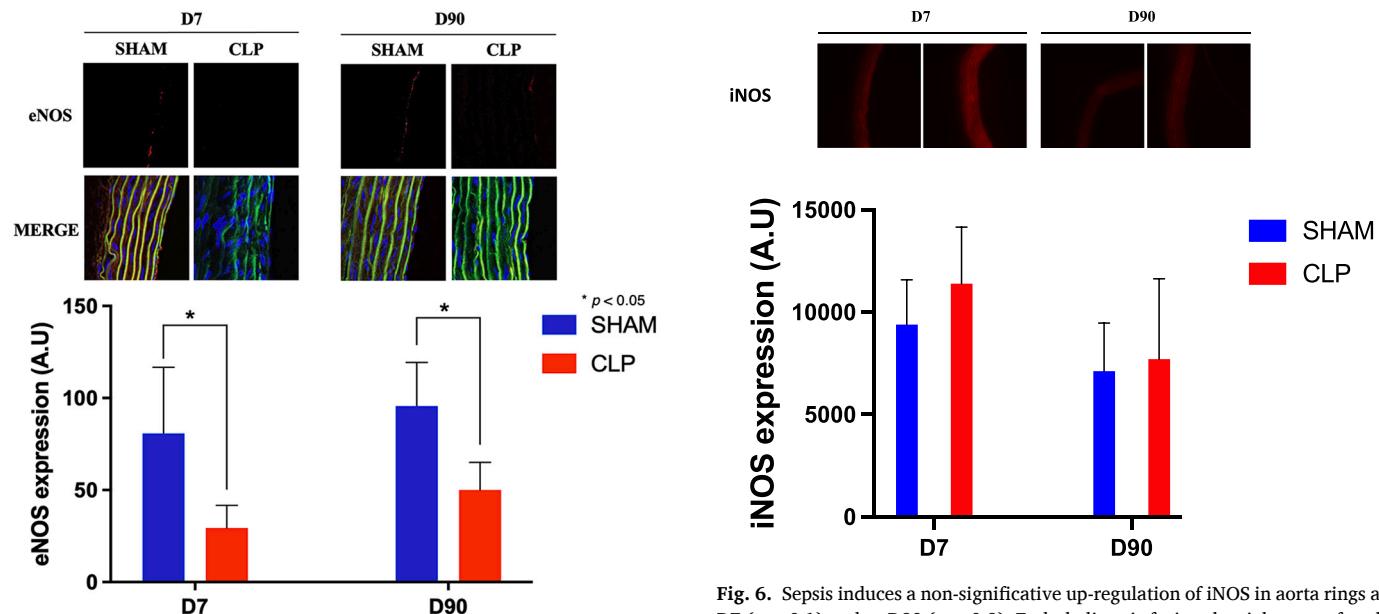


Fig. 5. Sepsis induces a persistent endothelial down-regulation of eNOS in aorta rings at D7 ($p = 0.04$) and at D90 ($p = 0.006$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. Data are expressed as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 6$; CLP $n = 6$. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$.

component relaxation in CLP as compared to SHAM, although

Fig. 6. Sepsis induces a non-significant up-regulation of iNOS in aorta rings at D7 ($p = 0.1$) and at D90 ($p = 0.9$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. Data are expressed as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 6$; CLP $n = 6$. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$.

significant was not reached (Supplementary data, Fig. E.2). The endothelial dysfunction in mesenteric arteries relaxation was altogether characterized by blunted endothelium-dependent relaxation mainly due

to the alteration of the NO pathway and possibly compensated by the prostanoids and EDH (Supplementary data, Fig. E.3). Indeed, endothelium-dependent contractile responses was observed in CLP rats compared to SHAM.

A 60% decrease in main mesenteric artery contraction was observed in CLP rats in response to 10–5 M PE and indomethacin adjunction indicated limited involvement of COX-mediated prostanoid pathway (Supplementary data, Fig. F.1). *In-vitro* inhibition of both COX by indomethacin and of the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) pathways in the presence of TRAM-34 plus UCL-1684 (10 μ M each) indicated a significant dependence on the NO pathway in SHAM rats (50% loss) that was barely significant in CLP rats most likely owing to the downregulation of the eNOS probably reducing availability of NO (Supplementary data, Fig. F.2). However, after indomethacin and L-NA adjunction, the contractile response of CLP mesenteric arteries was similar compared to untreated SHAM rings, indicating a dual contribution of prostanoids and NO pathways 3 months after the induction of peritonitis (Supplementary data, Fig. F.3). L-NA adjunction alone almost had the same effect (Supplementary data, Fig. F.4).

As changes in vascular reactivity are usually associated with wall remodeling, we compared the wall thickness in aorta after 3 months. No differences were found between the SHAM and the CLP group (Supplementary data, Fig. G).

4. Discussion

The present study was designed to assess the long-term impact of sepsis on vascular function. We focused on endothelial senescence as possible mechanism. The main finding was that sepsis induced arterial dysfunction with a time dependent *in situ* acquisition of inflammation and senescence phenotype in both conductance and resistance arteries, therefore pointing at a systemic long-lasting effect.

Our present data confirmed sepsis-induced arterial inflammatory and oxidative stress in the acute phase (28,29), and highlighted an ongoing pro-inflammatory vascular activation until 3 months. Indeed, inflammation and oxidative stress over-expression were maximal at D7 and persisted in the arterial wall at 3 months, confirming their potential impact on sepsis-induced arterial inflammation and atherosclerosis (30–32). Because ROS are known as mediators of both premature and replicative endothelial cell senescence (26,33,34), we also investigated SIPS. Furthermore, endothelial senescence is an early indicator of atheroprone vascular sites, suggesting its potential implication in atherogenesis initiation and progression (35). Furthermore, p53 and p21 have been identified as markers of ageing-related senescence in arteries of elderly patients (36). Our present data support the hypothesis that sepsis triggers the premature expression of key transcription factors involved in senescence: p53, p21 and p16 were overexpressed as early as D7 in the abdominal and cross segments of the aorta of septic rats. Overexpression of p53 and downstream p16 was even higher at D90 suggesting amplification over-time. Interestingly, the p53 up-regulation was located in the endothelial layer as demonstrated by confocal microscopy, thereby pointing at endothelial senescence involvement during septic shock. Interestingly, as reported by others (37,38), apoptosis remained minor.

Because, ageing ECs progressively acquire a dysfunctional phenotype, characterized by pro-oxidant, pro-inflammatory, pro-coagulant alterations, and a drastic loss in nitric oxide associated to cardiovascular diseases (39), one could potentially advance that septic shock-induced endothelial senescence is a mechanism leading to long-term cardiovascular complications. Indeed, in addition to data confirming that septic shock is associated to systemic arterial dysfunction during the acute phase mainly *via* altered NO pathway (9,40), we report herein the first long-term persistent vascular dysfunction: our data suggest remote endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries that was characterized by long-term blunted endothelium-dependent relaxation and contraction at D90. Interestingly, the selective over-expression of

endothelial p53 in rats' aortic rings infected by a p53-expressing adenovirus, reduced endothelium-dependent relaxations and NO formation (41). In line with these observations, our data strongly suggest that p53-induced senescence is pivotal in the initiation and maintenance of endothelial dysfunction. Our data provide new insight on the long-term impairment of NO production and vasoprotection possibly prompted by accelerated senescence after septic shock. Several studies support our observation with a link between sepsis and premature senescence. In a murine endotoxemia model, telomere shortening was observed after 48 h in kidney, spleen and blood cells, pointing at a systemic effect (42). *In-vitro* studies also reported premature senescence after lipopolysaccharides treatment of adipocytes (43), pulmonary epithelial cells (44), microglia cells (45), and dental pulp stem cells (46). In atherosclerosis-prone mice, undeciphered plaque formation occurs along the whole aorta culminating at 5 months after peritonitis indicating accelerated atherogenesis prompted by septic shock (47). Our present data highlight arterial senescence and MMP-9 as potential new mechanistic players, specifically up-regulated in the endothelium after 3 months. This matrix metalloproteinase is involved in pro-inflammatory responses, endothelial dysfunction, atherosclerosis (48) and cardiac senescence by promoting an inflamming profile (27).

While the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study trial (CANTOS) has proven the feasibility of targeting pro-inflammatory responses to reduce the risk of cardiovascular events in patients with anti-interleukin-1 β therapy, the majority of clinical trials that aimed at controlling the inflammation-mediated vascular responses have failed (49). Interestingly, in critically ill children, inflammation was associated to leukocyte telomere shortening suggesting inflammation-driven senescence (50). Of note, few *in vitro* and *ex vivo* studies describe a link between sustained inflammation and endothelial senescence while endotoxemia was reported to shorten telomeres in rat kidney, spleen and blood tissues with no investigation of endothelial damage (42). Nevertheless, senescent cell displays a pro-inflammatory phenotype termed SASP (senescence-associated secretory phenotype) (51), that may also contribute to accelerated atherothrombosis (52). Therefore, endothelial senescence appears as a promising pharmacological target to limit plaque formation and senotherapy by contributing to the reversal of the senescent phenotype (53–55) should also be considered as a next-generation therapy for septic patients at cardiovascular risk (56,57). In a trial combining two senolytic drugs, dasatinib, a pan inhibitor of tyrosine kinases, and quercetin, an antioxidant and anti-inflammatory drugs mainly targeting PI3-Kinase and serpins, promising preliminary data were described in patients with cardiovascular risk factors (58,59). Similarly, in hypercholesterolemic mice chronic treatment by dasatinib and quercetin reduced aortic calcification and consecutive loss of cardiovascular function (60). In a myocardial infarction model of aged mice, administration of ABT263 another senolytic drug improved myocardial remodeling, diastolic function, and overall survival (61).

Study limitations: Endothelial senescence is probably not the only mechanism by which sepsis promotes atheroma. Although standardized, peritonitis-induced sepsis probably leads to several pathogens load from one animal to another, resulting in a complex host response. Thus, the number of molecular and cellular pathways that could potentially underlie the effects of sepsis is huge and will require exploring other paths.

We report a new model of long-term septic shock-induced vascular dysfunction that was associated with persisting endothelium senescence and pro-inflammatory responses. Our data highlight the crucial needs for a long-term evaluation in sepsis since pro-inflammatory and pro-senescent vascular effectors, that are barely detectable, may drastically accumulate over time and alter the endothelial response.

5. Conclusion

The present findings indicate that sepsis accelerates endothelial senescence and induces persistent vascular dysfunction. Timely

acquisition of a senescence-induced endothelial and vascular dysfunction may partly explain atherosclerosis in sepsis survivors. Targeting pro-senescence endothelial cells with senolytics in sepsis may be of interest to delay endothelial senescence and improve vascular health and long-term outcome of sepsis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>.

Funding

Association d'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL, Strasbourg, France).

Data availability

All available data are published in the current manuscript.

Authors' contribution

All authors whose names appear on the submission contributed substantially to the conception and design of the study, the acquisition of data or the analysis and interpretation of the data.

- HM, FT and FM participated in designing the research
- HM, MK, JH, VSK, FT and FM participated in the writing and editing of the manuscript.
- HM, MK and KK performed the surgery on rat and the measurement of intra-femoral blood pressure.
- HM, MK, LC and KK performed the analyses on rat organs.
- HM, MK and KK performed the vascular reactivity.

Ethical approval

- Comité d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg (authorization number 15498).
- All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E 67-218-26).

Consent for publication

Not applicable.

At a glance

This work provides new insights into the role of septic shock leading to stress-induced premature senescence in vascular tissue. This senescent phenotype causes endothelial and vascular dysfunction involved in atherogenesis and may partly explain the increased risk of major adverse cardiovascular events in sepsis survivors.

Declaration of Competing Interest

No conflict of interest regarding the present manuscript has to be disclosed.

Acknowledgements

This project received financial support from the « Association d'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL, Strasbourg, France) ».

References

- [1] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, et al., The third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA*. 315 (8) (2016) 801–810.
- [2] K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F.R. Machado, R.D. Schachter, S. Finfer, Recognizing Sepsis as a Global Health priority - a WHO resolution, *N. Engl. J. Med.* 377 (5) (2017) 414–417.
- [3] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kieyvan, et al., Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the global burden of disease study, *Lancet.* 395 (10219) (2020) 200–211.
- [4] J.L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, et al., International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units, *JAMA*. 302 (21) (2009) 2323–2329.
- [5] C. Fleischmann, A. Scherag, N.K. Adhikari, C.S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, et al., Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated Sepsis. Current estimates and limitations, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (3) (2016) 259–272.
- [6] M. Shankar-Hari, G.D. Rubenfeld, Understanding long-term outcomes following Sepsis: implications and challenges, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 18 (11) (2016) 37.
- [7] A.N. Rizzo, P. Belvitch, R. Demeritte, J.G.N. Garcia, E. Letsiou, S.M. Dudek, Arg mediates LPS-induced disruption of the pulmonary endothelial barrier, *Vascul. Pharmacol.* 128–129 (2020) 106677.
- [8] E.V. Dolmatova, K. Wang, R. Mandavilli, K.K. Griendling, The effects of sepsis on endothelium and clinical implications, *Cardiovasc. Res.* 117 (1) (2021) 60–73.
- [9] J. Boisrame-Helms, H. Kremer, V. Schini-Kerth, F. Meziani, Endothelial dysfunction in sepsis, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11 (2) (2013) 150–160.
- [10] K.H. Park, W.J. Park, Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches, *J. Korean Med. Sci.* 30 (9) (2015) 1213–1225.
- [11] H.C. Prescott, J.J. Osterholzer, K.M. Langa, D.C. Angus, T.J. Iwashyna, Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study, *BMJ* 353 (2016) i2375.
- [12] M.H. Wu, P.Y. Tsou, Y.H. Wang, M.G. Lee, C.C.T. Chao, W.C. Lee, et al., Impact of post-sepsis cardiovascular complications on mortality in sepsis survivors: a population-based study, *Crit. Care* 23 (1) (2019) 293.
- [13] R.T. Mankowski, S. Yende, D.C. Angus, Long-term impact of sepsis on cardiovascular health, *Intensive Care Med.* 45 (1) (2019) 78–81.
- [14] O. Toussaint, E.E. Medrano, T. von Zglinicki, Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, *Exp. Gerontol.* 35 (8) (2000) 927–945.
- [15] A. Rufini, P. Tucci, I. Celardo, G. Melino, Senescence and aging: the critical roles of p53, *Oncogene.* 32 (43) (2013) 5129–5143.
- [16] N. Herranz, J. Gil, Mechanisms and functions of cellular senescence, *J. Clin. Invest.* 128 (4) (2018) 1238–1246.
- [17] G. Jia, A.R. Aroor, C. Jia, J.R. Sowers, Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction, *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.* 1865 (7) (2019) 1802–1809.
- [18] G. Katsuumi, I. Shimizu, Y. Yoshida, T. Minamino, Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018) 18.
- [19] E. Vasile, Y. Tomita, L.F. Brown, O. Kocher, H.F. Dvorak, Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis, *FASEB J.* 15 (2) (2001) 458–466.
- [20] J.A. Buras, B. Holzmann, M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (10) (2005) 854–865.
- [21] D. Rittirsch, M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, P.A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat. Protoc.* 4 (1) (2009) 31–36.
- [22] J.G. Abraldes, Y. Iwakiri, M. Loureiro-Silva, O. Haq, W.C. Sessa, R.J. Groszman, Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (5) (2006) G980–G987.
- [23] N. Idris Khodja, T. Chataigneau, C. Auger, V.B. Schini-Kerth, Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system, *PLoS One* 7 (2) (2012), e32093.
- [24] X. Zhai, Z. Yang, G. Zheng, T. Yu, P. Wang, X. Liu, et al., Lactate as a potential biomarker of Sepsis in a rat Cecal ligation and puncture model, *Mediat. Inflamm.* 2018 (2018) 8352727.
- [25] J. Boisrame-Helms, X. Delabranche, S.E. Degirmenci, F. Zobairi, A. Berger, G. Meyer, et al., Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats, *Thromb. Haemost.* 111 (1) (2014) 154–164.
- [26] M. Abbas, L. Jesel, C. Auger, L. Amoura, N. Messas, G. Manin, et al., Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cell aging and Thrombogenicity: role of the Ang II/AT1 receptor/NADPH oxidase-mediated activation of MAPKs and PI3-kinase pathways, *Circulation.* 135 (3) (2017) 280–296.
- [27] Y. Ma, Y.A. Chiao, R. Clark, E.R. Flynn, A. Yablichanskiy, O. Ghasemi, et al., Deriving a cardiac ageing signature to reveal MMP-9-dependent inflammatory signalling in senescence, *Cardiovasc. Res.* 106 (3) (2015) 421–431.
- [28] H. Kremer, C. Baron-Menguy, A. Tesse, Y. Gallois, A. Mercat, D. Henrion, et al., Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties, *Crit. Care Med.* 39 (6) (2011) 1414–1422.
- [29] J. Joffre, J. Hellman, C. Ince, H. Ait-Oufella, Endothelial responses in Sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202 (3) (2020) 361–370.
- [30] M. Back, A. Yurdagul Jr., I. Tabas, K. Oorni, P.T. Kovanen, Inflammation and its role in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Cardiol.* 16 (7) (2019) 389–406.

[31] D. Wolf, K. Ley, Immunity and inflammation in atherosclerosis, *Circ. Res.* 124 (2) (2019) 315–327.

[32] G.M. Gager, B. Biesinger, F. Hofer, M.P. Winter, C. Hengstenberg, B. Jilma, et al., Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome, *Vasc. Pharmacol.* 135 (2020) 106806.

[33] D. Burger, D.G. Kwart, A.C. Montezano, N.C. Read, C.R. Kennedy, C.S. Thompson, et al., Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence, *J. Am. Heart Assoc.* 1 (3) (2012), e001842.

[34] S. Khemais-Benkhiat, N. Idris-Khodja, T.P. Ribeiro, G.C. Silva, M. Abbas, M. Kheloufi, et al., The redox-sensitive induction of the local angiotensin system promotes both premature and replicative endothelial senescence: preventive effect of a standardized Crataegus extract, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 71 (12) (2016) 1581–1590.

[35] C.M. Warboys, A. de Luca, N. Amini, L. Luong, H. Duckles, S. Hsiao, et al., Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (5) (2014) 985–995.

[36] R.G. Morgan, S.J. Ives, L.A. Lesniewski, R.M. Cawthon, R.H. Andtbacka, R. D. Noyes, et al., Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305 (2) (2013) H251–H258.

[37] R.S. Hotchkiss, K.W. Tinsley, P.E. Swanson, I.E. Karl, Endothelial cell apoptosis in sepsis, *Crit. Care Med.* 30 (5 Suppl) (2002) S225–S228.

[38] B.G. Childs, D.J. Baker, J.L. Kirkland, J. Campisi, J.M. van Deursen, Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15 (11) (2014) 1139–1153.

[39] G. Machado-Oliveira, C. Ramos, A.R.A. Marques, O.V. Vieira, Cell senescence, multiple organelle dysfunction and atherosclerosis, *Cells* 9 (10) (2020).

[40] C. Ince, P.R. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J.A. Kellum, G.A. Ospina-Tascon, et al., The endothelium in Sepsis, *Shock.* 45 (3) (2016) 259–270.

[41] A. Kumar, C.S. Kim, T.A. Hoffman, A. Naqvi, J. Dericco, S.B. Jung, et al., p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-like factor 2, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (1) (2011) 133–141.

[42] N.M. Oliveira, E.C.S. Rios, T.M. de Lima, V.J. Victorino, H. Barbeiro, F. Pinheiro da Silva, et al., Sepsis induces telomere shortening: a potential mechanism responsible for delayed pathophysiological events in sepsis survivors? *Mol Med.* 22 (2017) 886–891.

[43] M. Zhao, X. Chen, Effect of lipopolysaccharides on adipogenic potential and premature senescence of adipocyte progenitors, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 (4) (2015) E334–E344.

[44] C.O. Kim, A.J. Huh, S.H. Han, J.M. Kim, Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 54 (2) (2012) e35–e41.

[45] H.M. Yu, Y.M. Zhao, X.G. Luo, Y. Feng, Y. Ren, H. Shang, et al., Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells, *Neuroimmunomodulation.* 19 (2) (2012) 131–136.

[46] X. Feng, G. Feng, J. Xing, B. Shen, W. Tan, D. Huang, et al., Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs), *Cell Tissue Res.* 356 (2) (2014) 369–380.

[47] A.M. Kaynar, S. Yende, L. Zhu, D.R. Frederick, R. Chambers, C.L. Burton, et al., Effects of intra-abdominal sepsis on atherosclerosis in mice, *Crit. Care* 18 (5) (2014) 469.

[48] J.M. Florence, A. Krupa, L.M. Booshehri, T.C. Allen, A.K. Kurdowska, Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1, *PLoS One* 12 (2) (2017), e0171427.

[49] P.M. Ridker, B.M. Everett, T. Thuren, J.G. MacFadyen, W.H. Chang, C. Ballantyne, et al., Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease, *N. Engl. J. Med.* 377 (12) (2017) 1119–1131.

[50] S. Verstraete, I. Vanhorebeek, E. van Puffelen, I. Derese, C. Ingels, S.C. Verbruggen, et al., Leukocyte telomere length in paediatric critical illness: effect of early parenteral nutrition, *Crit. Care* 22 (1) (2018) 38.

[51] B.G. Childs, M. Gluscevic, D.J. Baker, R.M. Laberge, D. Marquess, J. Dananberg, et al., Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (10) (2017) 718–735.

[52] N. Ruparelia, R. Choudhury, Inflammation and atherosclerosis: what is on the horizon? *Heart.* 106 (1) (2020) 80–85.

[53] D.J. Baker, T. Wijshake, T. Tchkonia, N.K. LeBrasseur, B.G. Childs, B. van de Sluis, et al., Clearance of p16^{INK4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders, *Nature.* 479 (7372) (2011) 232–236.

[54] M. Xu, T. Pirtskhalaia, J.N. Farr, B.M. Weigand, A.K. Palmer, M.M. Weivoda, et al., Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age, *Nat. Med.* 24 (8) (2018) 1246–1256.

[55] S. Misuth, M. Uhrinova, J. Klimas, D. Vavrincova-Yaghi, P. Vavrinec, Vildagliptin improves vascular smooth muscle relaxation and decreases cellular senescence in the aorta of doxorubicin-treated rats, *Vasc. Pharmacol.* 138 (2021) 106855.

[56] B.G. Childs, D.J. Baker, T. Wijshake, C.A. Conover, J. Campisi, J.M. van Deursen, Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis, *Science.* 354 (6311) (2016) 472–477.

[57] E. Dookun, J.F. Passos, H.M. Arthur, G.D. Richardson, Therapeutic potential of senolytics in cardiovascular disease, *Cardiovasc Drugs Ther.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07075-w>.

[58] L.J. Hickson, L.G.P. Langhi Prata, S.A. Bobart, T.K. Evans, N. Giorgadze, S. K. Hashmi, et al., Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease, *EBioMedicine.* 47 (2019) 446–456.

[59] J. Chang, Y. Wang, L. Shao, R.M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, et al., Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice, *Nat. Med.* 22 (1) (2016) 78–83.

[60] C.M. Roos, B. Zhang, A.K. Palmer, M.B. Ogrodnik, T. Pirtskhalaia, N.M. Thalji, et al., Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice, *Aging Cell* 15 (5) (2016) 973–977.

[61] A. Walaszczyk, E. Dookun, R. Redgrave, S. Tual-Chalot, S. Victorelli, I. Spyridopoulos, et al., Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction, *Aging Cell* 18 (3) (2019), e12945.

La sénescence endothéliale au niveau cellulaire

Dans cette partie de mon travail, portant sur des expérimentations in-vitro, l'hypothèse retenue est qu'une stimulation mimant un sepsis puisse contribuer à induire une SIPS des cellules endothéliales.

I.A Objectifs

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact de différentes stimulations mimant un sepsis sur le développement cellulaire de la sénescence endothéliale et d'en caractériser les mécanismes potentiellement impliqués.

I.B Matériels et méthodes

L'évaluation de la sénescence sur des lignées cellulaires immortalisées étant discutable, nous avons travaillé sur un modèle de cellules endothéliales primaires isolées à partir d'artères coronaires porcines.

I.B.1 Modalité d'isolement et de culture des cellules endothéliales d'artères coronaires porcines

Les branches circonflexes de l'artère coronaire gauche sont isolées à partir de coeurs de porcs frais, environ 2 à 3 heures après l'abattage (COPVIAL, Holtzheim, Alsace, France) (Figure 1). La graisse et le tissu cardiaque sont retirés manuellement avant que les artères ne soient rincées avec une solution tampon de phosphate salin ou *phosphate-buffered saline* (PBS) puis purgées. Les artères isolées sont ensuite traitées avec de la collagénase de type I pour libérer les cellules endothéliales de la matrice extracellulaire. Les cellules de 3-4 artères coronaires sont mises en culture en incubateur à 37°C et lavées à deux reprises après 6 heures avec du PBS, pour éliminer la graisse et les autres contaminants qui n'ont pas adhéré à la boîte de

culture. Les cellules sont ensuite cultivées dans des flasques dans du milieu MCDB-131 enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et incubées à 37°C, avec 5 % de CO₂.

Après 48 à 72 heures de culture, les cellules endothéliales sont décollées avec de l'acide trypsine-éthylènediamine-tétraacétique (trypsine-EDTA, Life Technologies SAS, Villebon-Sur-Yvette, France) de manière à être disposées dans des plaques 6 trous pour stimulation. Les cellules endothéliales de type P1 sont laissées ainsi durant 12h de manière à bien adhérer à la surface. Avant de débuter tout type de stimulation, les cellules endothéliales ont été synchronisées en phase G1/G0 du cycle cellulaire *via* un protocole de privation de sérum durant 2h.

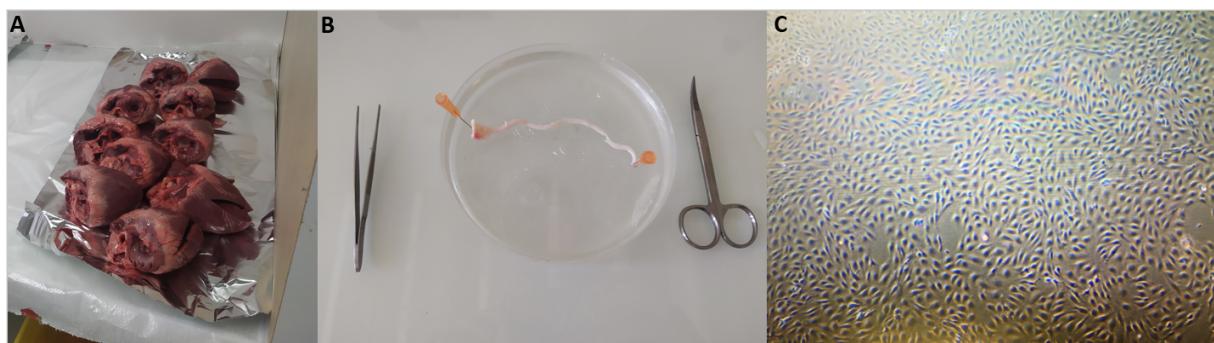


Figure 1 : Extraction de cellules endothéliales à partir de branches circonflexes de l'artère coronaire gauche de cœur de porc. A : Cœurs de porcs utilisés comme source pour les artères coronaires. B : Artères coronaires isolées. C : Cellules endothéliales en culture, 48 à 72 heures après l'extraction.

I.B.2 *Stimulations mimant un sepsis*

Les cellules endothéliales ont ensuite été traitées durant 24 heures afin de mimer un sepsis sans que les paramètres d'incubation ne soient modifiés.

Les différents types de stimulations utilisées étant :

- Du LPS d'*Escherichia coli* O127:B8 et d'*E. Coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) en µg/ml
- Des bactéries inactivées par la chaleur à savoir d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* aussi appelé HKSA pour *Heat Killed S. aureus* (en bactéries/ml) provenant du laboratoire de microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

A noter, pour évaluer un effet concentration-réponse, plusieurs concentrations ont été testées.

Après 24h, le milieu de stimulation est retiré et les cellules sont lavées à deux reprises par du PBS et la culture est poursuivie durant 48 heures dans du milieu MCDB-131 enrichi de 10 % de SVF.

I.B.3 Évaluation de la sénescence

Hormis l'accroissement de taille, une autre caractéristique phénotypique des cellules sénescentes est l'augmentation du nombre et du volume des lysosomes. Les lysosomes sont des vésicules intra cytoplasmiques contenant une réserve d'hydrolases acides actives à un pH compris entre 3,5 et 5 et capables de dégrader les différents constituants cellulaires : nucléases, protéases, osidases et lipases. La β -galactosidase est naturellement présente dans les lysosomes. Bien que son activité soit optimale à pH 4, une activité résiduelle existe à pH 6. Ainsi, du fait de l'augmentation de la quantité de lysosomes, donc de β -galactosidase, cette activité devient détectable dans les cellules sénescentes et est désignée comme « *senescent associated- β -galactosidase* » (SA- β -Gal). La détection de l'activité est basée sur l'hydrolyse d'un substrat fluorogène, la fluorescéine di-beta-D-galactopyranoside (FDG). Après hydrolyse et excitation laser, le FDG émet une fluorescence verte et est détecté par cytométrie en flux pour la quantification de la sénescence cellulaire.

La SA- β -Gal a été évaluée dans les cellules endothéliales par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), après marquage par un substrat fluorogène, le C12FDG (5-dodecanoylaminofluorescéine di- β -D-galactopyranoside, Invitrogen, Thermofisher, Illkirch, France). En résumé, les cellules endothéliales ont été alcalinisées (pH porté à 6) avec de la chloroquine (300 μ M) pendant 1 h, suivie d'une incubation de 1 h avec du C12FDG (33 μ M). Les cellules ont ensuite été lavées par du PBS, décollées avec de la trypsine et analysées à l'aide du logiciel CellQuest (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Les paramètres de diffusion de la lumière ont été réglés pour éliminer les cellules mortes et les débris subcellulaires. Le signal vert de la fluorescéine-C12 a été mesuré et l'activité SA- β -Gal a été

estimée en utilisant l'intensité de fluorescence moyenne de la population. Les gains d'auto-fluorescence ont été déterminés à partir de cellules non marquées.

I.C Résultats

Devant l'absence de différences détectable en termes d'activité SA- β -Gal entre les cellules contrôles et cellules stimulées, quelle que soient les conditions et le temps de la stimulation, de nombreux paramètres ont été modifiés pour optimiser le modèle expérimental.

Parmi les principaux paramètres modifiés, de manières séparées, figurent :

- La densité d'ensemencement des cellules par cm^2
- La synchronisation ou l'absence de synchronisation par un protocole de privation de sérum
- La modification du pourcentage de SVF dans le milieu de culture
- Le temps d'incubation avec les molécules mimant le sepsis
- La co-stimulation par différentes molécules mimant le sepsis
- L'adjonction de TNF- α
- La comparaison avec la stimulation de cellules endothéliale pré-sénescentes (P2) et P3 plus avancées dans le processus de sénescence
- La culture avec un inhibiteur de NO synthase de type L-NAME (NO synthase inhibitor)
- L'évaluation sur des HCAEC (human coronary artery endothelial cells)

Partant de ce constat, l'analyse de la littérature a permis de déterminer la nécessité de cofacteurs indispensables à l'activation des cellules endothéliales, présents dans le sang mais absents des milieux de cultures standards, tels CD14, la *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) ou la fraction C5 du complément.

Ainsi, les mêmes expériences ont été réalisées en ajoutant 10% de sang total de volontaires sains au milieu MCDB-131 (à partir de tubes héparinés), afin d'optimiser l'activation endothéliale en réponse au sepsis, comme suggéré dans une publication récente (Nymo et al., 2016) (Figure 2).

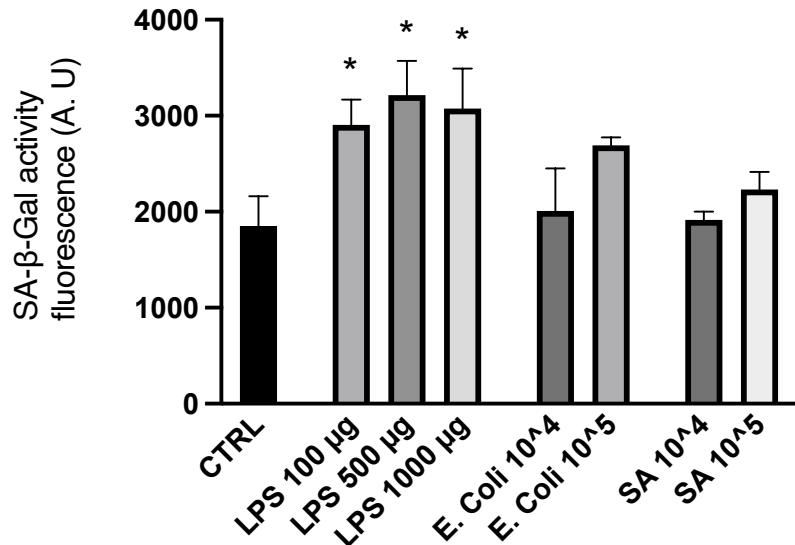


Figure 2 : Activité SA-β-Gal en intensité de fluorescence (unité arbitraire). * p <0.05

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes des intensités de fluorescence +/- déviation standard. (n = 5 pour le LPS et n= 3 pour les bactéries inactivées).

Les résultats ont mis en évidence une augmentation significative de l'activité SA-β-Gal après stimulation par LPS avec un effet concentration dépendant témoignant d'une sénescence prématuée induite. A noter, après 3 jours la viabilité évaluée par test au bleu trypan était supérieure à 95 %.

Concernant la stimulation par des bactéries inactivées par la chaleur, on observe une tendance à l'augmentation de l'activité SA-β-Gal non significative probablement du fait d'un manque de puissance et d'une mort cellulaire plus importante à confirmer (viabilité non évaluée par test au bleu trypan à ce jour).

II La sénescence endothéliale et leucocytaire dans le choc septique chez l'Homme

II.A Sénescence endothéliale et choc septique

Ce troisième volet des travaux personnels, ambitionnait d'évaluer à travers la recherche clinique chez l'Homme la survenue potentielle d'une sénescence endothéliale prématurée induite par le stress que représente le choc septique chez les patients de réanimation. Cette hypothèse confirmée permettrait, en partie, d'améliorer nos connaissances physiopathologiques de l'athérogenèse accélérée à l'origine de complications cardio-vasculaires plus fréquentes chez les survivants de sepsis et de choc septique.

Dans ce cadre, pour confirmer notre hypothèse chez l'homme, nous avons mis en place un protocole de recherche au sein du service de Médecine Intensive – Réanimation du Nouvel Hôpital Civil aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Cette étude, intitulée SeneShock, vise à isoler des cellules endothéliales chez des patients en choc septique et évaluer l'impact de ce dernier sur la sénescence endothéliale précoce ou tardive.

Cette tâche a été rendue difficile par l'impossibilité de prélever des tissus vasculaires afin d'en extraire les cellules endothéliales de manière ensuite à les analyser qualitativement. Dans ce contexte, nous avons donc tenté d'isoler des cellules endothéliales circulantes (CEC) dans un premier temps, de manière à pouvoir analyser les éventuelles caractéristiques de sénescence dans un second temps.

Les cellules endothéliales circulantes sont des cellules qui se sont détachées de la paroi vasculaire et qui se retrouvent ainsi dans le sang circulant en très faible quantités. Il s'agit de cellules représentant moins de 0,01 % des cellules nucléées du sang des patients en choc septique, soit maximum entre 100 et 500 cellules par ml. Ce sont donc des événements considérés comme rares, difficiles à isoler y compris par technique de cytométrie en flux.

La sénescence étant un processus évolutif avec le temps, un groupe de contrôle (volontaires sains) est indispensable pour vérifier que l'augmentation de la sénescence n'est pas due au temps mais bien au choc septique.

II.B Objectifs

Pour cela, l'étude SeneShock a pour **objectif principal** de mettre en évidence les processus précoces (à 1, 7 et 14 jours) et tardifs (à 6 mois et 12 mois) de **sénescence cellulaire endothéiale** et leucocytaire dans les états de chocs septiques.

Parmi les **objectifs secondaires** de l'étude, il est question :

- d'évaluer l'impact de la sénescence endothéiale sur la mortalité dans les chocs septiques.
- de comparer le taux moyen des marqueurs de sénescence au niveau endothérial entre les volontaires sains et des patients victimes d'un choc septique, sur la même durée (temps de l'étude).

II.C Matériels et méthodes

L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence des cellules endothéliales circulantes (CEC) dans le sang périphérique de patients en choc septique et de témoins sains afin d'évaluer dans un second temps le degré de sénescence de ces cellules.

Les critères d'inclusion des patients en choc septique reposent sur les critères de la définition de sepsis 3.

Les critères de non-inclusion des patients étant les suivants :

- Grossesse
- Allaitement
- Refus de participation à l'étude du patient, et de la personne de confiance lorsque le patient est dans l'incapacité de donner son consentement à l'inclusion et lors de sa participation.
- Patient sous mesure de protection juridique (tutelle, curatelle ou sauvegarde de justice).

Le groupe contrôle a été préalablement défini avec l'aide du centre d'investigation clinique (CIC) des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg à partir des critères d'inclusions suivants :

- Sujet, homme ou femme, d'âge compris entre 50 et 70 ans inclus
- Ne présentant aucune pathologie pouvant interférer avec l'étude, comme une maladie cardio-vasculaire, ou un diabète, ou un trouble de la coagulation.
- Ayant un examen clinique normal caractérisé par :
 - une fréquence cardiaque comprise entre 60 et 90 bpm,
 - une pression artérielle < 140/90 mmHg,
 - une fréquence respiratoire entre 12 et 20 cycles/min,
 - une SpO₂ > 95%
 - une température comprise entre 36,5 et 37,5 °C.

Les critères de non-inclusion des volontaires sains sont les suivants :

- Sujet ayant une IMC > 30 kg/m² ou < 18 kg/m²
- Sujet présentant un facteur de risque cardio-vasculaire, notamment diabète, dyslipidémie, hypertension artérielle, hérité cardio-vasculaire, tabagisme actif ou sevré, trouble connu de l'hémostase, ...
- Sujet présentant un antécédent chirurgical hormis végétations, amygdalectomie, appendicectomie, chirurgie orthopédique mineure, chirurgie pariétale (hernies inguinales ou crurales)
- Sujet présentant un antécédent d'allergies hormis l'allergie saisonnière
- Sujet ayant une médication en cours, notamment un traitement contraceptif ou un traitement hormonal substitutif ou un complément alimentaire à base d'Oméga 3. Les prises de paracétamol à la demande sont tolérées.
- Sujet fumeur (tabac ou cannabis) :
 - actif
 - sevré depuis moins de 10 ans et avec antécédent de consommation > 5 Paquets-année
- Consommation d'alcool non conforme aux recommandations d'experts de « Santé publique France » de 2017, soit :
 - une consommation dépassant plus de 10 verres standards par semaine et plus de 2 verres standards par jour ;
 - une absence de jours dans la semaine sans consommation d'alcool.

- Sujet en période d'exclusion (déterminée par une étude précédente ou en cours)
- Sujet employé par le service de réanimation médicale du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg
- Sujet non affilié à un régime de protection sociale d'assurance maladie
- Sujet sous tutelle ou curatelle
- Sujet privé de liberté par décision judiciaire ou administrative.

Ce projet de recherche clinique intitulé SeneShock dont le promoteur est le CHU de Strasbourg a obtenu l'avis favorable d'un comité de protection des personnes (Dossier 2018/45 – ID RCB 2018-A00718-47) et fait l'objet d'un enregistrement dans le registre *ClinicalTrials.gov* en 2018.

II.C.1 Isolement des CEC en cytométrie en flux : mise au point d'un premier panel

Les CEC représentent environ 0,001% à 0,01% des cellules nucléées du sang circulant de patients en réanimation (Tapia et al., 2019; Yoo et al., 2015). Un premier panel de cytométrie en flux (Tableau 1) a été réalisé en se basant sur les travaux les plus récents lors de l'initiation de ce travail de thèse, à savoir ceux de l'équipe de De Biasi (De Biasi et al., 2018), proposant une optimisation des techniques de références habituelles pour la détection des CEC par cytométrie en flux. Il s'agit donc de cellules d'environ 10 µm x 50 µm dont le phénotype est défini par les caractéristiques suivantes : CD45-, CD133-, CD34+, CD31+, CD146+, CD309+.

Compte tenu de la rareté attendue des CEC dans le sang périphérique, des cellules de la lignée *human pulmonary microvascular endothelial cells* (HPMEC), présentant des caractéristiques proches des CEC, ont été utilisées pour mettre en place un protocole d'analyse par cytométrie en flux. L'ensemble des expériences en cytométrie en flux a été réalisé sur un cytomètre BD LSRFortessa (BD, Franklin Lakes, USA). Les analyses ont été réalisées sur le logiciel FACSDiva 3.1.

Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur	Référence
CD34	PE	Biolegend	343605
CD45/CD133	BV421	Biolegend	304031/372807
CD31	BV605	Biolegend	303121
CD309	APC	Biolegend	393005

Tableau 1 : Anticorps de cytométrie utilisés pour le premier panel de CEC.

Des mono-marquages et des contrôles isotypiques ont permis de régler le voltage des tubes photomultiplicateurs spécifiques aux fluorochromes utilisés et de déterminer les populations négatives et positives (Figure 3).

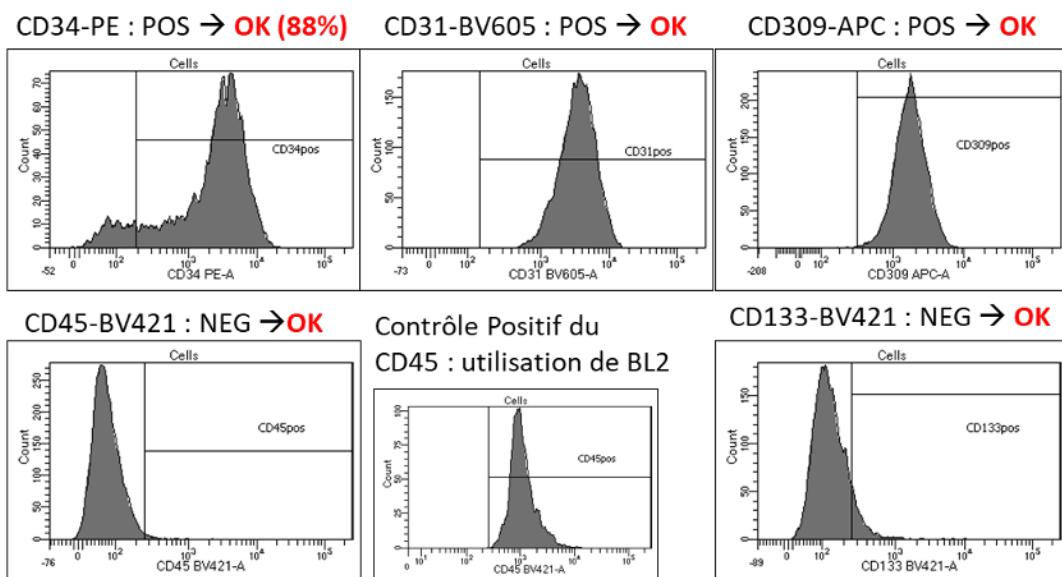


Figure 3 : Mono-marquage par les anticorps du premier panel de CEC.

Les HPMEC n'exprimant pas le CD45, une lignée cellulaire de lymphocyte B (BL2) a été utilisée pour valider cet anticorps. Des cellules marquées avec l'ensemble des fluorochromes moins un (méthode fluorescences minus one) ainsi qu'un marquage avec l'ensemble des anticorps ont permis de finaliser ces mises au point (Figure 4).

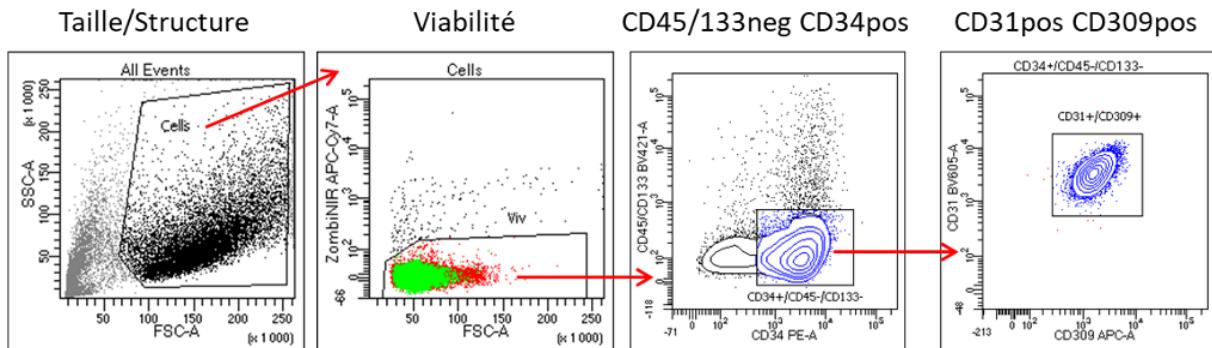


Figure 4 : Identification des HPMEC à partir du premier panel de CEC.

Des dilutions de cellules HPMEC (jusqu'à 0,01%) dans des cellules mononucléées sanguines aussi appelés *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) ou du sang total nous ont permis de valider la sensibilité de notre analyse. Après dilution **dans des PBMC**, l'analyse par cytométrie en flux retrouve bien 0,01% de cellules HPMEC (Figure 5).

De la même manière, après dilution dans du **sang total** et élimination des globules rouges par centrifugation sur gradient de densité, un nombre inférieur de cellules HPMEC (0,001%) est retrouvé (Figure 6). Ces analyses ont été répétées et confirmée sur des cellules de la lignée HCAEC non immortalisée.

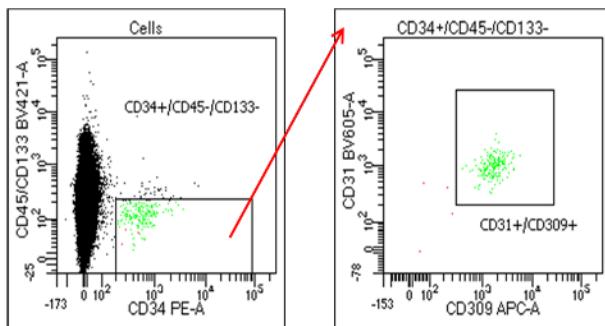


Figure 5 : Détection d'HPMEC après dilution dans des PBMC avec un ratio de 0,01 %.

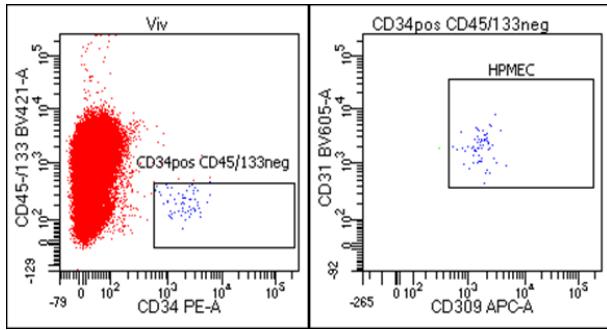


Figure 6 : Détection d'HPMEC après dilution dans du sang total avec un ratio de 0,01 %.

A la suite de la mise en place de ce protocole d'analyse, nous avons évalué l'intérêt d'un enrichissement en cellules CD34 par tri magnétique (Miltenyi), préalablement à l'analyse en cytométrie. A partir d'un premier échantillon de sang issu de patient, nous avons isolé des PBMC par centrifugation sur gradient de densité. La moitié de ces PBMC a été marquée avec le panel d'anticorps et directement analysée par cytométrie. L'autre moitié a été utilisée pour isoler les cellules CD34+ circulantes grâce au tri magnétique. L'analyse des PBMC sans enrichissement en CD34 s'est avérée techniquement irréalisable. La rareté des CEC ayant impliqué des heures d'analyse par cytométrie en flux et a généré des obstructions répétées du cytomètre (Figure 7).

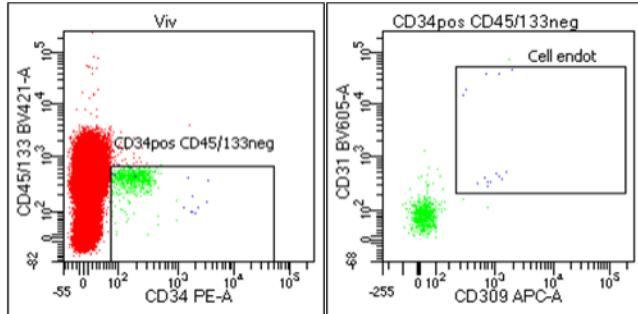


Figure 7 : Détection des CEC à partir de sang total de patients sans enrichissement en CD34+.

L'analyse après enrichissement en cellules CD34 nous a permis de mettre en évidence de très rares événements mais qui ne représentent pas un nuage de points suffisamment dense pour permettre d'affirmer la présence d'une population de CEC (entre 6 et 60 cellules éparses) (Figure 8).

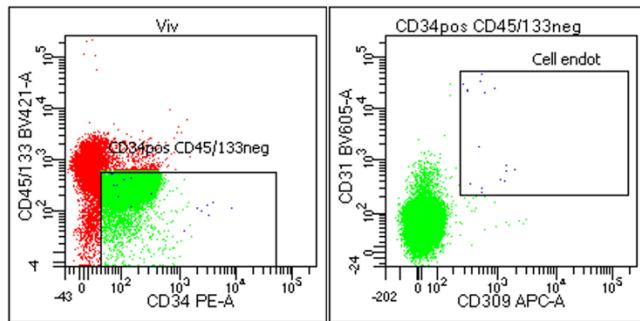


Figure 8 : Détection des CEC à partir de sang total de patients avec enrichissement en CD34+.

Sur les tests à partir du premier panel de CEC réalisés à partir des techniques de références décrites par l'équipe de De Biasi, le nombre de CEC observé semble inférieur au nombre attendu et retrouvé dans la littérature de manière générale.

II.C.2 Isolation des CEC en cytométrie en flux : mise au point d'un second panel

Dans le but d'améliorer la sensibilité de cette analyse des CEC, nous avons réalisé une modification du panel d'anticorps sur la base d'autres travaux de la littérature scientifique (Tableau 2). Nous avons notamment inclus le marqueur CD146, classiquement cité dans la littérature pour caractériser les CEC (Leroyer et al., 2019).

Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur	Référence
CD45/CD133	PE	BD/BD	555483/566593
CD34	PC7	BD	348811
CD146	BB700	BD	746081
CD309	A647	BD	560495
CD31	APC-Cy7	BD	563653

Tableau 2 : Anticorps de cytométrie utilisés pour le second panel de CEC.

Le choix des fluorochromes a été réalisé dans le but de pouvoir transposer notre panel d'anticorps par la suite sur un cytomètre de type trieur de cellules (BD FACSMelody™ Cell

Sorter, BD, Franklin Lakes, USA) pour isoler ces CEC et évaluer la sénescence. Des mises au point ont été réalisées afin de mettre en place ce deuxième panel d'analyse à l'aide des lignées HPMEC et BL2 à nouveau (Figure 9).

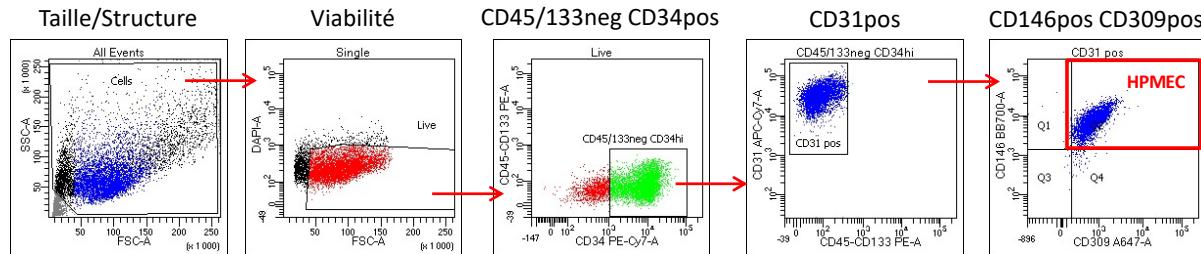


Figure 9 : Détection des HPMEC à partir du second panel de détection des CEC.

A la suite de la mise en place de ce panel, nous avons analysé quatre échantillons issus de patients. La préparation des cellules a été précédée d'une étape de lyse des globules rouges (BD Pharm lyse) afin d'éviter toute perte de cellules rares pouvant survenir lors d'un isolement de PBMC sur gradient de densité et d'un enrichissement magnétique en CD34 (Miltenyi). L'analyse de ces quatre échantillons a mis en évidence un nombre très faible d'évènements cellulaires pouvant correspondre à des CEC (Figure 10).

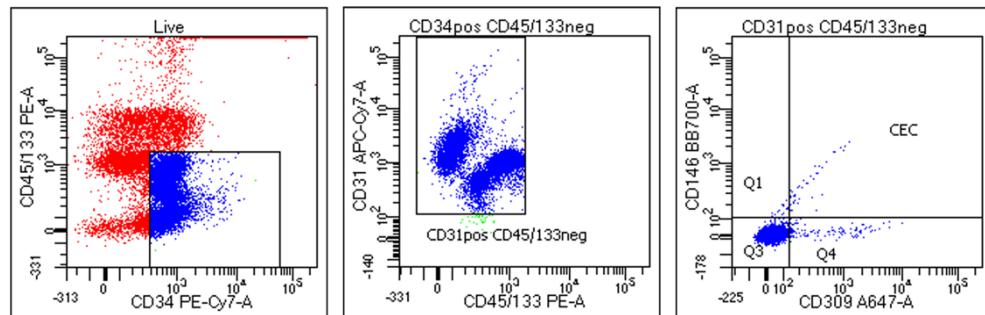


Figure 10 : Exemple de détection de CEC (CD146+) chez un patient avec le second panel.

Ainsi, à partir de ce second panel, les évènements correspondant aux caractéristiques des CEC représentent 0,001% à 0,1% des cellules CD34 circulantes, ce qui est à nouveau très inférieur à ce qui est attendu dans la littérature. De plus, ces évènements ne forment pas un nuage de points homogène dans la fenêtre d'analyse.

En revanche, une importante population de cellules CD45-, CD133-, CD34+, CD31+, CD309+ mais CD146- est mise en évidence (Figure 10).

En conclusion, dans les échantillons de sang issus de patients, nous mettons en évidence une très faible population de cellules présentant les caractéristiques phénotypiques de CEC (CD146 positives), ainsi qu'une faible population de cellules exprimant le même phénotype, mais CD146 négatives, dont la nature exacte reste à préciser. Le faible nombre de cellules CEC mises en évidence (CD146 positive) permet difficilement d'envisager un tri cellulaire pour préciser les caractéristiques moléculaires de ces cellules et analyser leur degré de sénescence.

II.C.3 Isolement des CEC par immuno-séparation Magnétique et mise au point d'un marqueur de sénescence

L'identification puis le tri cellulaire semblant difficilement réalisable pour les CEC *via* une technique de cytométrie en flux, nous avons expérimenté une approche différente pour isoler ces cellules à partir d'une séparation immunomagnétique, précédemment décrite dans la littérature (Gendron & Smadja, 2016) grâce à des billes magnétiques (de type Pan Mouse IgG kit, Thermofisher, Illkirch, France) couplées à un anticorps anti-CD146 (de type clone F4-35H7 [S-endo], Biocytex, Marseille, France).

Des échantillons de sang de patients en choc septique ont été incubés avec le mélange de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD146 durant une nuit à 4°C (Figure 11). A noter, l'isolement avec l'anticorps CD146 permet de discriminer les CEC des cellules progénitrices endothéliales (Woywodt et al., 2003).

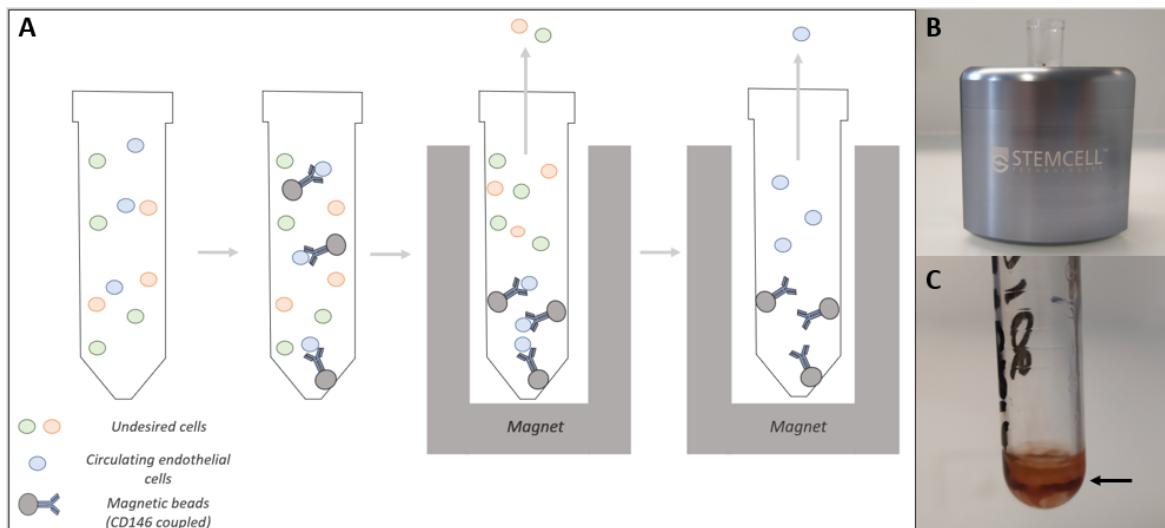


Figure 11 : Isolement des CEC grâce à des billes magnétiques. A : Principe de la technique. B : billes magnétiques et aimant. C : Billes magnétiques restant attachées à la paroi. La flèche noire indique la couche de billes CD146 magnétiques avec les CEC adhérentes.

Après incubation, le tube est inséré dans l'aimant de type EasySep™ Magnets (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) et le contenu éliminé, de manière à ne garder que les cellules exprimant le CD146. Les cellules CD146 positives sont fixées à la paroi du tube grâce aux billes magnétiques et sont ensuite remises en suspension dans du milieu.

Après élimination des cellules non désirées, l'objectif était de pouvoir détecter la sénescence des CEC par mesure de l'activité bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal). Les cellules préalablement isolées ont été traitées au FDG. La fluorescence du FDG a été visualisée par microscopie en fluorescence (ou en épifluorescence, microscope Zeiss Apotome) (Figure 12). Différentes conditions ont été testées pour la validation de la méthode. Entre autres, nous avons évalué de quelle manière le retrait ou non des billes magnétiques affectait le signal FDG des CECs, l'imagerie et le processus d'isolement.

Deux marqueurs nucléaires différents (DAPI et Hoechst) ont été utilisés pour la localisation et l'identification des cellules. Le DAPI étant plus cytotoxique et altérant le métabolisme cellulaire, il ne permet pas le dosage du SA- β -gal (Bielawski et al., 2001). Par conséquent, le Hoechst a été choisi comme marqueur nucléaire et comparé au DAPI, avec des résultats similaires concernant la localisation et l'identification des cellules.

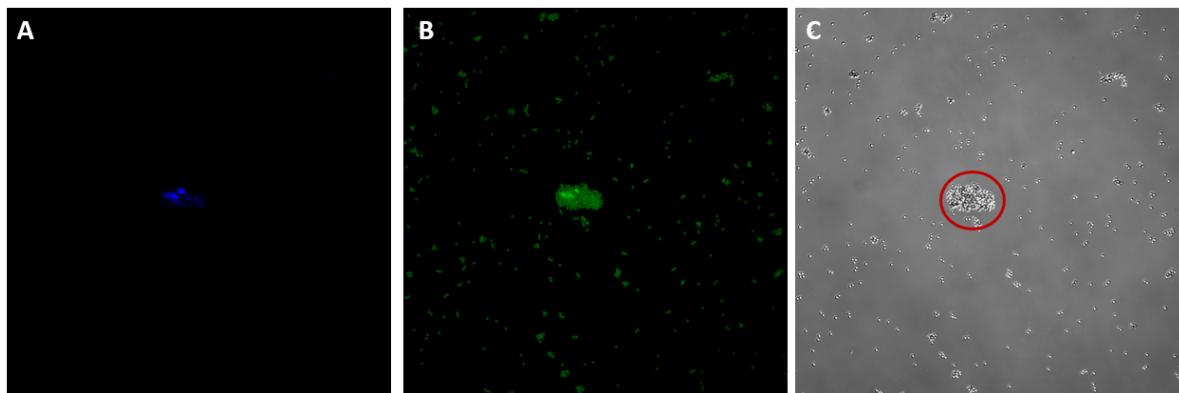


Figure 12 : Fluorescence de CEC provenant de patients en choc septique. A : Marqueur Hoechst. B : Marqueur FDG. C : Lumière blanche. Le cercle rouge indique l'endroit où les billes magnétiques s'agglutinent autour d'une CEC, ce qui permet de les différencier des autres particules fluorescentes. La photo a été prise avec un grossissement de 20x.

Pendant cette étape, l'isolement des CEC n'a pas été limitant, cependant l'interprétation de l'activité SA- β -Gal a engendré des difficultés dues à de nombreuses billes agglutinées autour des CEC modifiant l'intensité de la fluorescence du signal FDG. Le détachement des billes magnétiques entraîne une perte importante de cellules déjà rares. Ainsi, la trop faible quantité de cellules restantes ne permet plus de pouvoir analyser la sénescence avec un nombre suffisant d'événements.

II.D Sénescence leucocytaire et choc septique

Cette deuxième partie du projet de recherche clinique a pour but d'évaluer la survenue potentielle d'une immunosénescence prématuée induite par le stress que représente le choc septique chez les patients de réanimation. Cette hypothèse confirmée permettrait, en partie, d'expliquer la survenue d'infections plus fréquentes émaillant le syndrome post-sepsis.

Contrairement à la première partie de l'expérimentation chez l'Homme dont le but est d'évaluer la sénescence endothéliale, les modulations de l'immunosénescence sont beaucoup plus faciles à évaluer à partir de simples prélèvements sanguins.

De la même manière, la sénescence étant un processus évolutif avec le temps, un groupe de contrôle de volontaires sains a été préalablement défini pour comparer l'évolution de la sénescence entre les patients en choc septique et les volontaires sains au cours du temps.

II.E Objectifs

Pour cela, l'étude SeneShock (mentionnée précédemment) a pour **objectif principal** de mettre en évidence les processus précoces (à 1, 7 et 14 jours) et tardifs (à 6 mois et 12 mois) de sénescence cellulaire endothéliale **et leucocytaire** dans les états de chocs septiques.

Parmi les **objectifs secondaires** de l'étude, il est question :

- d'évaluer l'impact de la sénescence leucocytaire sur la mortalité dans les chocs septiques.
- de comparer le taux moyen des marqueurs de sénescence au niveau leucocytaire entre les volontaires sains et des patients victimes d'un choc septique, sur la même durée (temps de l'étude).

II.F Matériels et méthodes

La plupart des cellules de l'immunité innée ayant une durée de vie relativement courte ne permettant pas de suivre de manière optimale la sénescence jusque 6 mois voire 12 mois, nous avons concentré nos évaluations de l'immunosénescence sur des cellules de l'immunité adaptative. Une revue de la littérature a mis en évidence que la majorité des études se porte sur la sénescence lymphocytaire et en particulier sur les lymphocytes T CD8+.

Parmi les méthodes utilisées, plusieurs approches sont privilégiées dans la littérature pour évaluer cette sénescence lymphocytaire.

La première approche consiste à évaluer la maturation lymphocytaire T selon quatre stades :

i) le stade naïf, ii) le stade mémoire centrale, iii) le stade mémoire effecteur et iv) le stade effecteur terminal (ou mémoire effecteur RA). Ces quatre stades peuvent être individualisés par l'étude des marqueurs CD45RA et CCR7 (Golubovskaya & Wu, 2016; Xu & Larbi, 2017) :

- Lymphocytes T naïfs : CD45RA+ CCR7+
- Lymphocytes T mémoire centrale : CD45RA- CCR7+
- Lymphocytes T mémoire effecteur : CD45RA- CCR7-
- Lymphocytes T effecteur terminal (ou mémoire effecteur RA) : CD45RA+ CCR7-

Avec cette approche, la sénescence est définie par une perte de lymphocytes T naïfs (CD45+ CCR7+) associée à l'accumulation de lymphocytes T effecteur terminal (CD45RA+ CCR7-) (Williams-Gray et al., 2018; Xu & Larbi, 2017). Les sujets jeunes présentant une proportion plus importante de lymphocytes T naïfs, alors que les sujets âgés présentent significativement plus de lymphocytes T mémoires (Duggal et al., 2018).

La deuxième approche utilisée dans la littérature consiste à étudier les marqueurs CD28 et CD57. La sénescence se caractérise alors par la perte de l'expression du marqueur CD28 associée à l'apparition du marqueur CD57 (Frimpong et al., 2019; Williams-Gray et al., 2018; Xu & Larbi, 2017). Il existe une proportion plus importante de lymphocytes T CD28+ CD57- chez les sujets jeunes alors que les sujets âgés présentent significativement plus de

lymphocytes T CD8+ CD28- CD57+ (Covre et al., 2018; Duggal et al., 2018; Onyema et al., 2012; Williams-Gray et al., 2018)

Ce phénotype CD28- CD57+ est par ailleurs associé *ex vivo* à une diminution des capacités prolifératives de ces lymphocytes T (Brenchley et al., 2003).

La **troisième approche** repose sur la mise en évidence d'une expression plus importante du marqueur KLRG1 sur les lymphocytes T CD8+ des sujets âgés en comparaison à l'expression sur les LT de sujets jeunes (Covre et al., 2018; Onyema et al., 2012).

Ainsi, la sénescence lymphocytaire peut être objectivée par :

1. L'étude des marqueurs CD45RA et CCR7 :

- Une perte de lymphocytes T CD8+ Naïfs (diminution de CD45RA+/CCR7+)
- Une accumulation de lymphocytes T CD8+ effecteur terminal (ou mémoire effecteur RA) avec augmentation du marquage CD45RA+ CCR7-

2. L'étude des marqueurs CD28 et CD57 :

- Une perte de lymphocytes T CD8+ Naïfs (CD28+ CD57-)
- Une accumulation de lymphocytes T CD28- CD57+

3. L'étude du marqueur KLRG1 :

- Une augmentation d'expression de KLRG1

A partir de cette revue de la littérature, nous avons mis en place un panel d'anticorps (Tableau 3) permettant l'analyse de la sénescence selon ces trois approches (Figure 13).

Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur	Référence
CD57	FITC	Beckman Coulter	IM0466U
CCR7	PE	R&D	FAB197P
CD45RA	PC7	Beckman Coulter	B10821
KLRG1	Vio-blue	Miltenyi	130-123-613
CD8	BV605	BD	564115
CD4	BV711	BD	563033
CD28	APC	BD	561792
CD3	APC-H7	BD	560275

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour le panel de sénescence par cytométrie en flux.

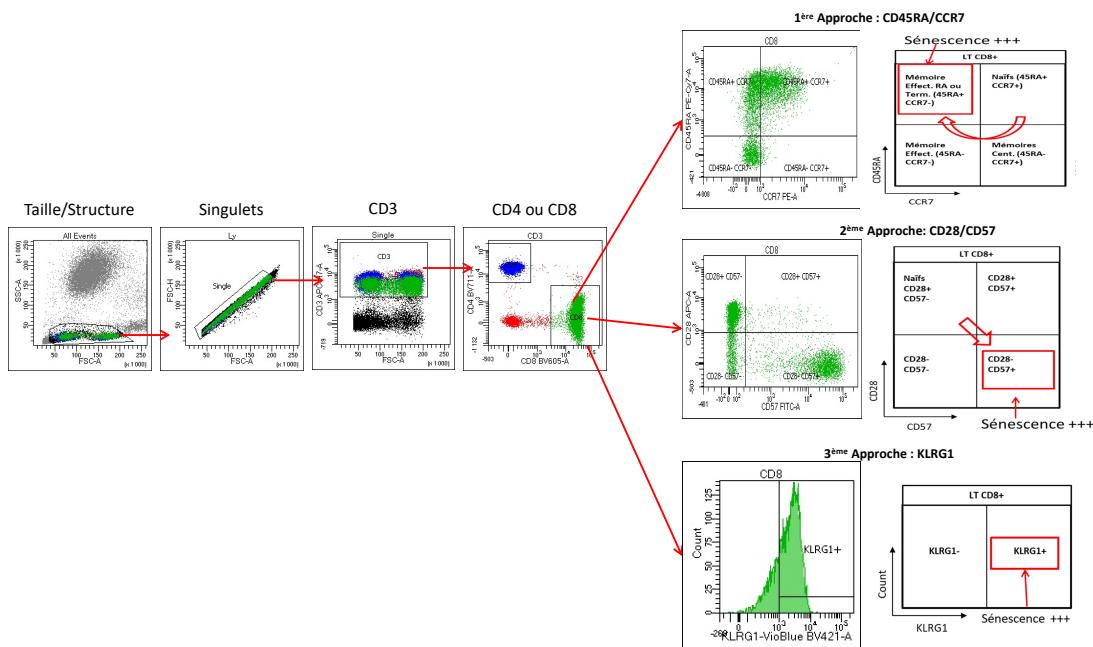


Figure 13 : Stratégie de marquage pour l'analyse de la sénescence de lymphocytes T CD8+ à l'aide des différentes approches.

De manière à valider ce panel d'anticorps, nous avons analysé des échantillons de sang issus de 5 sujets jeunes (moins de 35 ans) et de 5 sujets âgés (plus de 75 ans) en fonction des différents marqueurs à partir d'échantillons de sang de donneurs provenant de l'établissement français du sang (EFS) de Strasbourg.

Les validations des mises au point sont rapportées ci-dessous.

1. Première approche *via* l'étude des marqueurs CD45RA et CCR7 (Figure 14A)

Conformément à ce qui est attendu, nous observons une diminution significative de plus de 50 % des lymphocytes T CD8+ naïfs chez les sujets contrôles âgés en comparaison aux sujets contrôles jeunes.

Nous retrouvons également un doublement significatif de la proportion de lymphocytes T CD8+ effecteurs terminaux chez les sujets contrôles âgés en comparaison aux sujets contrôles jeunes.

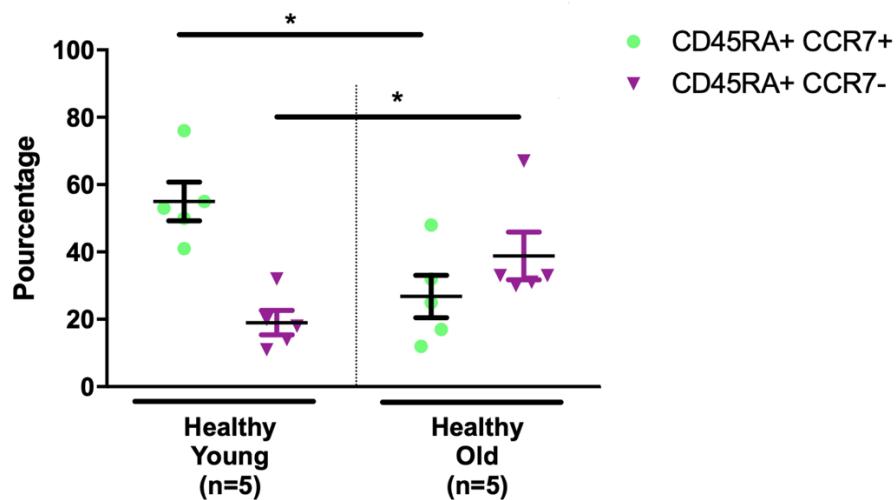


Figure 14A : Marquage CD45RA et CCR7 des lymphocytes CD8+. * p <0.05.

(CD45RA+ CCR7+ : rond vert ; CD45RA+ CCR7- : triangle inversé violet)

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes des intensités de fluorescence +/- erreur standard de la moyenne (SEM).

2. Deuxième approche *via* l'étude des marqueurs CD28 et CD57 (Figure 14B)

Dans cette approche, la dispersion des valeurs obtenues ne permet pas d'atteindre la significativité. Nous observons cependant une tendance à la diminution des cellules CD28+ CD57- et une légère augmentation de cellules CD28- CD57+ chez les contrôles âgés en comparaison aux contrôles jeunes, qui nécessiterait l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons pour être confirmée.

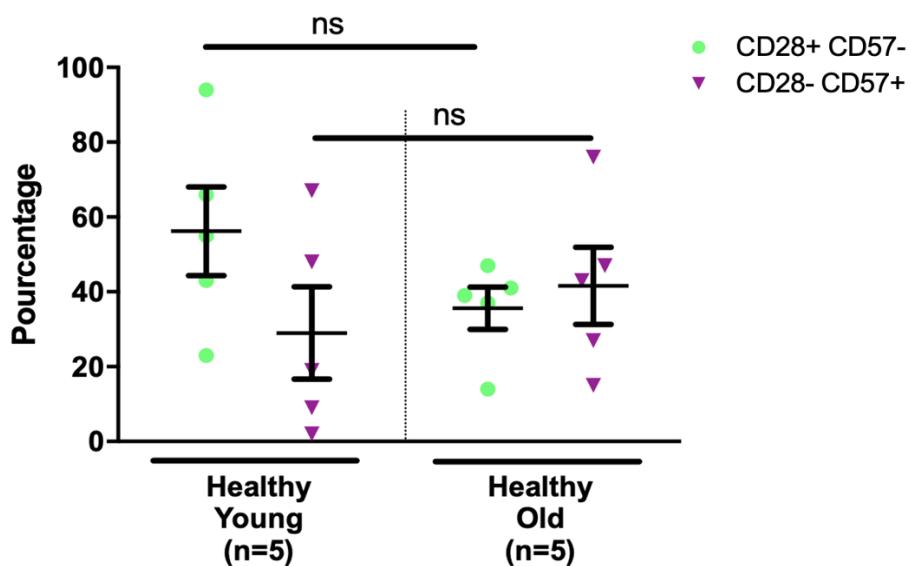


Figure 14B : Marquage CD28 et CD57 des lymphocytes T CD8+. * p <0.05.

(CD28+ CD57- : rond vert ; CD28- CD57+ : triangle inversé violet)

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes des intensités de fluorescence +/- erreur standard de la moyenne (SEM).

3. Troisième approche *via* l'étude du marqueur KLRG1 par les lymphocytes T CD8+ (Figure 14C)

Conformément à ce qui est attendu dans la littérature, nous observons un doublement significatif de la proportion de cellules exprimant KLRG1 parmi les lymphocytes T CD8+ des sujets contrôles âgés en comparaison aux sujets contrôles jeunes.

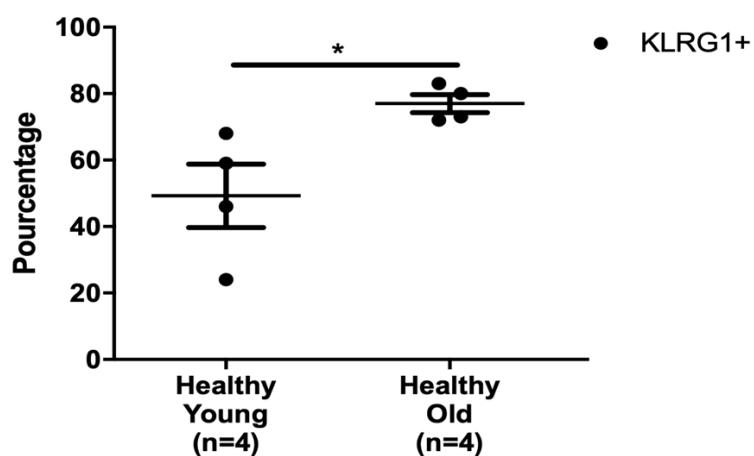


Figure 14C : Expression du marqueur KLRG1 par les lymphocytes T CD8+. * p <0.05.
Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes du pourcentage de la population de lymphocytes T CD8+, +/- erreur standard de la moyenne (SEM).

En conclusion, cette analyse préliminaire utilisant trois méthodes d'évaluation de la sénescence des lymphocytes T CD8+ nous permet de confirmer la conformité de notre panel d'anticorps. Elle confirme aussi que les variations de phénotypes liées à la sénescence dans les lymphocytes T CD8+ de sujets sains que nous avons évalués sont similaires à celles décrites dans la littérature scientifique.

L'étape suivante, consistant à évaluer l'évolution de cette sénescence lymphocytaire chez les patients en chocs septiques comparée à celle des volontaires sains durant la même période, est en cours à travers l'étude SeneShock en cours de recrutement.

III Article 2 : Revue de la littérature

Article publié dans la revue « Annals of Intensive Care » en décembre 2021.

REVIEW

Open Access



Long-term cardiovascular complications following sepsis: is senescence the missing link?

Hamid Merdji^{1,2}, Valérie Schini-Kerth^{1,3}, Ferhat Meziani^{1,2*}  and Florence Toti^{1,3}

Abstract

Among the long-term consequences of sepsis (also termed “post-sepsis syndrome”) the increased risk of unexplained cardiovascular complications, such as myocardial infarction, acute heart failure or stroke, is one of the emerging specific health concerns. The vascular accelerated ageing also named premature senescence is a potential mechanism contributing to atherothrombosis, consequently leading to cardiovascular events. Indeed, vascular senescence-associated major adverse cardiovascular events (MACE) are a potential feature in sepsis survivors and of the elderly at cardiovascular risk. In these patients, accelerated vascular senescence could be one of the potential facilitating mechanisms. This review will focus on premature senescence in sepsis regardless of age. It will highlight and refine the potential relationships between sepsis and accelerated vascular senescence. In particular, key cellular mechanisms contributing to cardiovascular events in post-sepsis syndrome will be highlighted, and potential therapeutic strategies to reduce the cardiovascular risk will be further discussed.

Highlights

- With improved management of patients, sepsis survivors are increasing each year.
- Early cardiovascular complications, of yet undeciphered mechanisms, are an emerging health issue in post-sepsis syndrome.
- Premature senescence of endothelium and vascular tissue is proven an accelerated process of atherogenesis in young septic rats.
- An increasing body of clinical evidence point at endothelial senescence in the initiation and development of atherosclerosis.
- Prevention of premature senescence by senotherapy and cardiological follow-up could improve long-term septic patients' outcomes.

Keywords: Septic shock, Sepsis, Stress-induced premature senescence (SIPS), Atherosclerosis

Sepsis as a global health priority

Sepsis is considered as a life-threatening multiple organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection altering systemic arterial function [1, 2]. Although the global burden is difficult to ascertain, recent data estimated 48.9 million cases and 11 million sepsis-related deaths worldwide in 2017, which accounted for almost 20% of all global deaths [3]. Sepsis has, therefore, been recognized as a global health priority by the World

*Correspondence: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

¹ Department of Intensive Care (Service de Médecine Intensive-Réanimation), Nouvel Hôpital Civil, Hôpital Universitaire de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

Health Organization (WHO) [4]. Indeed septic shock, the most severe form of sepsis characterized by profound circulatory and cellular/metabolic failure [5], remains the leading cause of mortality in intensive care unit (ICU) [6, 7]. However, in high-income countries the long-term survival is improving, with approximately 14 million sepsis survivors each year [8], raising at the same time new health consequences and a significant burden for patients and society [9, 10]. Thus, post-sepsis syndrome involves multiple long-term deficits, including the immune, cognitive, psychiatric, renal, and cardiovascular systems [11, 12]. Notably, nearly a quarter of sepsis survivors will be readmitted to hospital within 30 days of discharge [13]. Long-term consequences greatly contribute to the high total economic cost of the disease, which is estimated to be around US\$67 billion yearly in the USA alone [14].

Cardiovascular-associated post-sepsis complications as an emerging serious health threat

Recent data suggest that the increased risk of long-term mortality among sepsis survivors could be related to increased post-sepsis cardiovascular diseases [15]. Hence, sepsis survivors have an increased risk to develop cardiovascular disease with elevated major adverse cardiovascular events (MACE), including nonfatal myocardial infarction, acute heart failure or nonfatal stroke. Hospitalization for severe pneumonia leads to an increased risk of developing cardiovascular disease that persists for at least 10 years [16]. Yende et al. found that survivors of severe sepsis had a twofold increased cardiovascular risk within the first year following hospital discharge as compared to risk- and age-matched individuals. Interestingly, in this study even the subgroup of sepsis survivors who did not have cardiovascular disease before the hospitalization, had a higher risk of subsequent cardiovascular events [17]. Recently, a meta-analysis of 27 studies (that overall included 1,950,033 sepsis survivors and 3,510,870 unique non-septic control subjects) reported that sepsis may represent a long-term cardiovascular disease risk factor, with magnitudes of relative risk comparable to those of conventional cardiovascular disease risk factors such as hypertension, dyslipidemia, and diabetes mellitus. This potential risk remaining significantly elevated for at least 5 years after hospital discharge [18]. A possible explanation would be an unusual rate of atherosclerosis of still undeciphered origin [19]. One highly likely contributor is the endothelium as demonstrated for the acute phase in preclinical data [20] and indirectly from clinical assessment of biomarkers of the endothelial dysfunction [21]. Sepsis switches the endothelial protective functions to an athero-thrombogenic profile resulting in endothelial dysfunction with altered vasoregulation, loss of barrier function, potentiating inflammation, and

coagulation abnormality [22–24], finally leading to organ dysfunction.

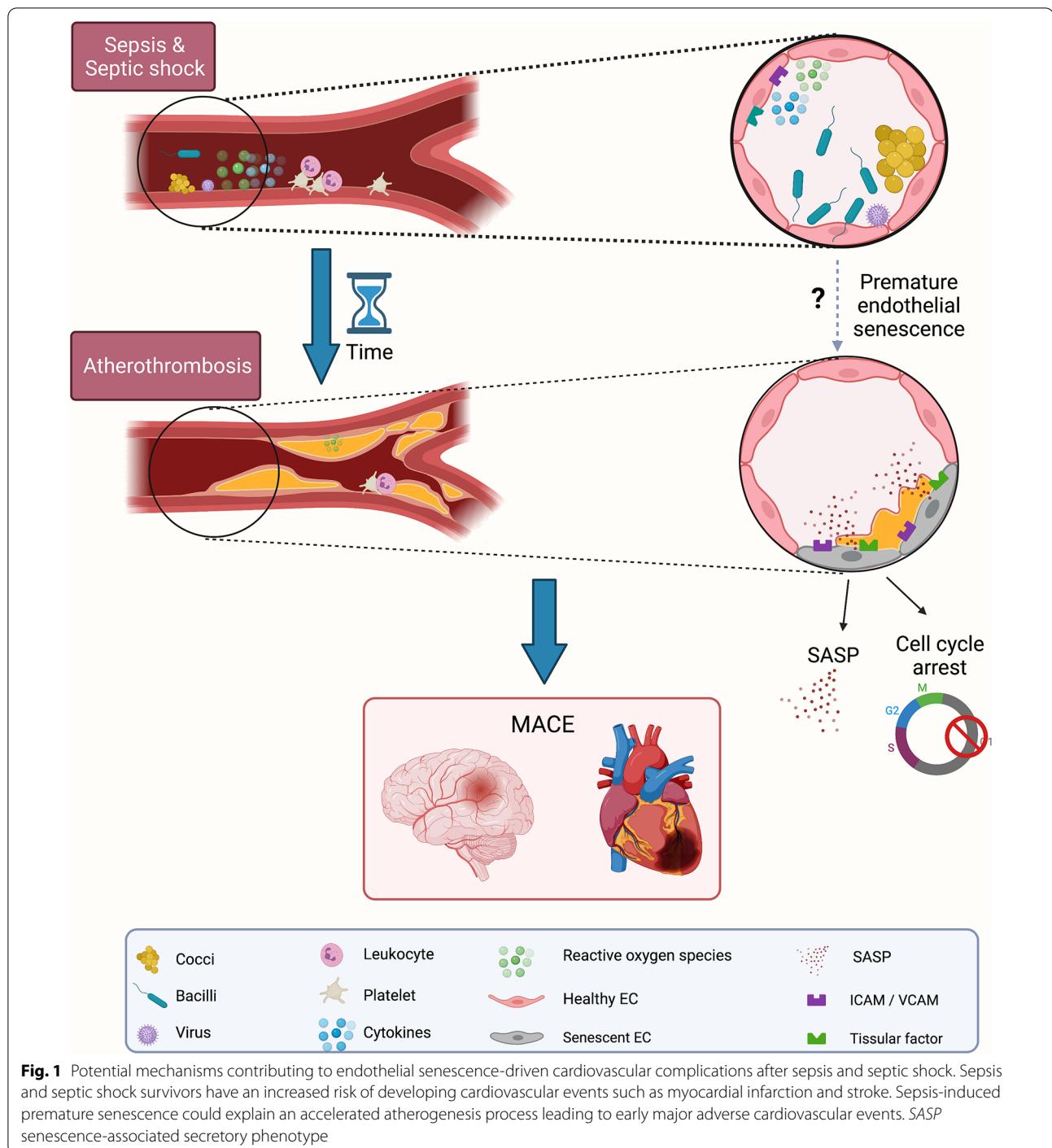
A potential mechanism that may link acute and chronic endothelial dysfunction is accelerated vascular aging associated with premature endothelial senescence ultimately promoting atherosclerosis (Fig. 1).

Vascular senescence, atherosclerosis and inflamming

As a proof of concept of the link between endothelial senescence and atherosclerosis, a pioneer work reported that senescent endothelial cells (ECs) overlay atherosclerotic plaques, in post-mortem aortic arch histological section from patients older than 70 years. These ECs were seen as a thin continuous layer of luminal senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity, highly represented in vulnerable plaque [25]. In mice, early signs of endothelial senescence are detected predominantly at sites of disturbed flow and low shear stress during atherogenesis in middle-aged individuals. In senescent animal models, they are characterized by an early endothelial dysfunction, suggesting that premature ageing-related endothelial dysfunction may contribute to the focal nature of the pathology and possibly also to its initiation and progression [26]. In rodent models or human samples, a progressive expression of senescence biomarkers p53, p21, p16 and accumulating SA- β -Gal activity occur in ageing vascular tissues, including endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and macrophages [27–32].

In an experimental model of atherosclerosis-prone mice, Kaynar and colleagues [33] corroborated the association between sepsis and the occurrence of cardiovascular events by showing that the cecal ligation and puncture (CLP) accelerates aortic atherosclerotic plaque formation within the subsequent 5 months. Although these data confirm the association between sepsis and atherosclerosis, the authors concluded that the mechanism underlying this accelerated atherogenesis remains to be fully elucidated. Indeed, these data point at the need to develop long-term follow-up murine models of sepsis.

Recently, our team has provided new insights by characterizing a premature vascular senescence in rats after CLP surgery [34]. Sepsis was found to accelerate premature senescence in the aorta tissue with a significant upregulation of p53 and downstream p21 and p16 senescence markers as early as 7 days after CLP, values peaking 3 months later. Of note, p53 was mainly detected in the aortic endothelium by immunofluorescence and confocal microscopy, thereby confirming its prime and key role. In addition, our data suggest a link between arterial senescence and a remote endothelial dysfunction in



conductance and resistance arteries that was characterized by long-term blunted endothelium-dependent relaxation and contraction at 3 months.

One of the other main contributors to the link between sepsis, senescence and atherosclerosis for cardiovascular disease is “inflammageing” [35]. Inflammageing is a condition characterized by high blood and tissue levels of

pro-inflammatory markers associated with susceptibility to cardiovascular diseases in the elderly. The physiopathology of inflammageing remains poorly deciphered to date and relies on immune cell dysregulation, microbiota alteration, increased intestinal permeability, chronic infections, and central obesity. At the cellular level, mitochondrial-mediated oxidative stress, activation of the

NLRP3 inflammasome, and genetic susceptibility contribute to inflammasome as well as the pro-inflammatory senescence-associated secretory phenotype (SASP) [36]. Advanced atherosclerotic plaques exhibit both senescence markers such as p16 and the SASP which further fuels inflammation, thereby destabilizing the atherosclerotic plaque, suggesting a key contribution of inflammasome [37].

Senescence: causative or coincidental to ageing?

Physicians and philosophers of ancient Greece have already questioned aging as a disease or a natural process [38]. The Hippocratic Corpus asserted that old age inevitably led to frailty and then death and therefore, considered aging an incurable disease. The interrogation persisted in the Latin world, "*Senectus ipsa morbus est*", reflecting the disease paradigm while the Roman Galen asserted that, unlike diseases that are abnormal, ageing is universal and is, therefore, a natural process. Although the answer is not yet conclusive and this dichotomy still persists nowadays, recent progress in biology allows a better understanding of aging and senescence [39].

Relicative senescence: a reversible biological clock?

Senescence describes a state of permanent replicative arrest in normally proliferative cells, losing their ability to divide. Senescence is not equivalent to quiescence or death. Indeed, senescent cells remain alive and metabolically active for a long period of time [40]. Besides exiting the cell cycle, the senescent state is accompanied by a failure to re-enter the cell cycle in response to mitogenic stimuli. Other signatures of senescence are a metabolic reprogramming, autophagy and abnormal chromatin rearrangement such as heterochromatin foci, also named senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) whereupon proliferation-related genes are silenced. In addition, the senescence-associated secretory phenotype (SASP) initiates a paracrine dissemination of an oxidative and pro-inflammatory signal. At the level of the organism, senescence may appear as a defense mechanism that limits the replication of old or damaged cells bearing accumulated DNA repair errors and therefore preserves the homeostatic balance.

"Relicative senescence" is considered a biological clock triggered by aging. It is caused by a progressive shortening of telomeres upon each cell division. Described in 1961, the "Hayflick limit" was the first in vitro observation of a limited human fibroblast proliferation capacity, their mitosis being abolished after 50 cell divisions, despite the addition of growth factors and the absence of contact inhibition [41]. Initially, several investigators were skeptical, claiming an isolated in vitro artifact. There is now accumulating in vivo evidences that

senescence is a true biological response [42] progressively occurring in age-related pathologies, including type 2 diabetes, obesity, atherosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), pulmonary fibrosis, and many others diseases [43]. In the recent decades, the improvement of public health has extended the human lifespan thereby favoring senescence as a major emerging contributing factor to chronic diseases in the elderly [44].

Accelerated senescence: a stress-induced ageing

In the year 2000, pioneering work by Olivier Toussaint and others showed that there is another major way, other than chronological aging, for cells to become senescent. Indeed, a significant cellular stress can trigger senescence even in young cells through a phenomenon known as stress-induced premature senescence (SIPS) [45]. Recent studies suggest that sepsis, during which many stressors are severely and significantly exacerbated, is a condition of accelerated senescence.

Features of senescent cells shared by replicative senescence cells and stress-induced premature senescence cells

Several markers are used to detect senescent cells, among which senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal) activity is the current gold standard for the detection of senescence in vitro [46]. The characteristic elevation of the β -Gal activity in senescent cells is the consequence of both the enzyme upregulation [47] and an increase in the lysosomal mass [48] with paradoxical decline of their degradative ability. β -Galactosidase strictly operates at pH 4.5 in healthy cells while it is still active at a pH of 6 in senescent cells, thereby enabling the quantification of a senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity [49], one of the first markers to be used [50].

However, SA- β -Gal activity measurement is a comparative assessment. In vivo, its high sensitivity to sampling and storage conditions and the need of a non-senescent control make the analysis challenging. Nevertheless, key characteristics in all types of cell senescence are the cell cycle arrest and the upregulation of p53, p21 and p16, often used as alternate markers. Still, cell cycle arrest itself cannot be considered a truly surrogate marker of senescence, since multiple other cellular responses can drive a stable replicative arrest. Indeed, the inability to express proliferation genes, even in a pro-mitogenic environment [51, 52] distinguishes senescence from quiescence, a non-proliferative state of the cells that is readily reversed in response to mitogens. Of note, mTOR plays a key role in the shift between senescence or quiescence: when both p53 and mTOR are activated, cells become senescent, while the sole activation of p53 leads to quiescence [53].

In the absence of reliable direct assessment, several nonexclusive markers are reported in the literature to monitor cell senescence. The shift to a SASP [54], also termed senescence-messaging secretome [55], is undoubtedly the most characteristic and relevant feature of senescent cells and a potential biomarker. SASP is associated with the secretion of a plethora of immune modulators, inflammatory cytokines, growth factors, chemokines, and proteases in the close microenvironment of senescent cells.

Each cell lineage is characterized by a specific SASP pattern of secreted molecules, several studies suggesting up to 103 molecules per cell type [43], often determined by the initiator of the senescence response [56]. Key components are pro-inflammatory tumor necrosis factor alpha (TNF- α), cytokines interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-1 alpha (IL-1 α) having a juxtacrine role on the surrounding cells, and matrix metalloproteinases (MMP-1 and -3) acting on the remodeling of

the extracellular matrix [57]. SASP relies on pro-inflammatory signaling pathways including NF- κ B, mTOR and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) [58].

How is senescence different from apoptosis?

Apoptosis and senescence pathways drive alternative cell fates that can often be triggered by the same stressors. Indeed, once cells enter senescence, they become resistant to extrinsic apoptosis by overexpressing decoy receptor 2 (DCR2) [43] and to intrinsic apoptosis [59–61] at least in part via the upregulation of BCL-2 family members [62], being themselves under the eventual control of p53, a transcription factor involved in autophagy, DDR, cell cycle progression and apoptosis [63]. While high stress can lead to apoptosis, then cell death and elimination, intermediate stress can lead to senescence with persisting cell dysfunction (Fig. 2).

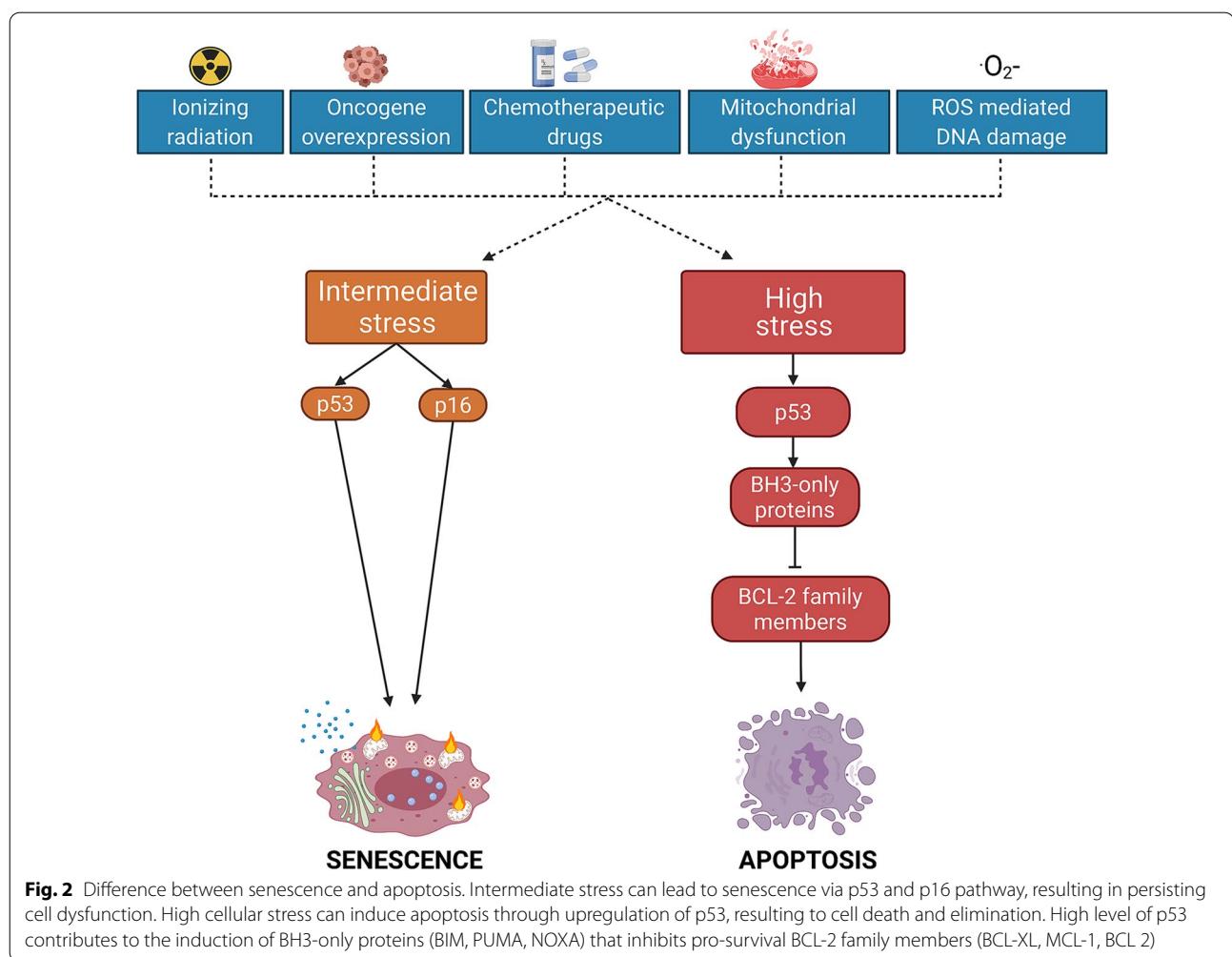


Fig. 2 Difference between senescence and apoptosis. Intermediate stress can lead to senescence via p53 and p16 pathway, resulting in persisting cell dysfunction. High cellular stress can induce apoptosis through upregulation of p53, resulting to cell death and elimination. High level of p53 contributes to the induction of BH3-only proteins (BIM, PUMA, NOXA) that inhibits pro-survival BCL-2 family members (BCL-XL, MCL-1, BCL 2)

Endothelial senescence and vascular ageing

Endothelial senescence is associated with morphological and metabolic changes. The EC becomes flatter ("egg on a plate morphology") and enlarged with an increasingly polypoid nucleus (Fig. 3). Such changes are accompanied by a loss of cytoskeleton integrity, and altered cell proliferation, migration and angiogenesis [64]. Senescent ECs show decreased endothelial nitric oxide (NO) production, increased endothelin-1 (ET-1) release, elevated inflammatory response [65], and have a specific SASP profile detailed in Table 1 [66–69].

Accumulating senescent ECs induce vascular, structural, and functional changes shifting the endothelium from a protective monolayer preserving physiological vascular tone to a pro-inflammatory, athero-thrombo-genic dysfunctional barrier, all of which favor cardiovascular disease [70, 71] (Fig. 4).

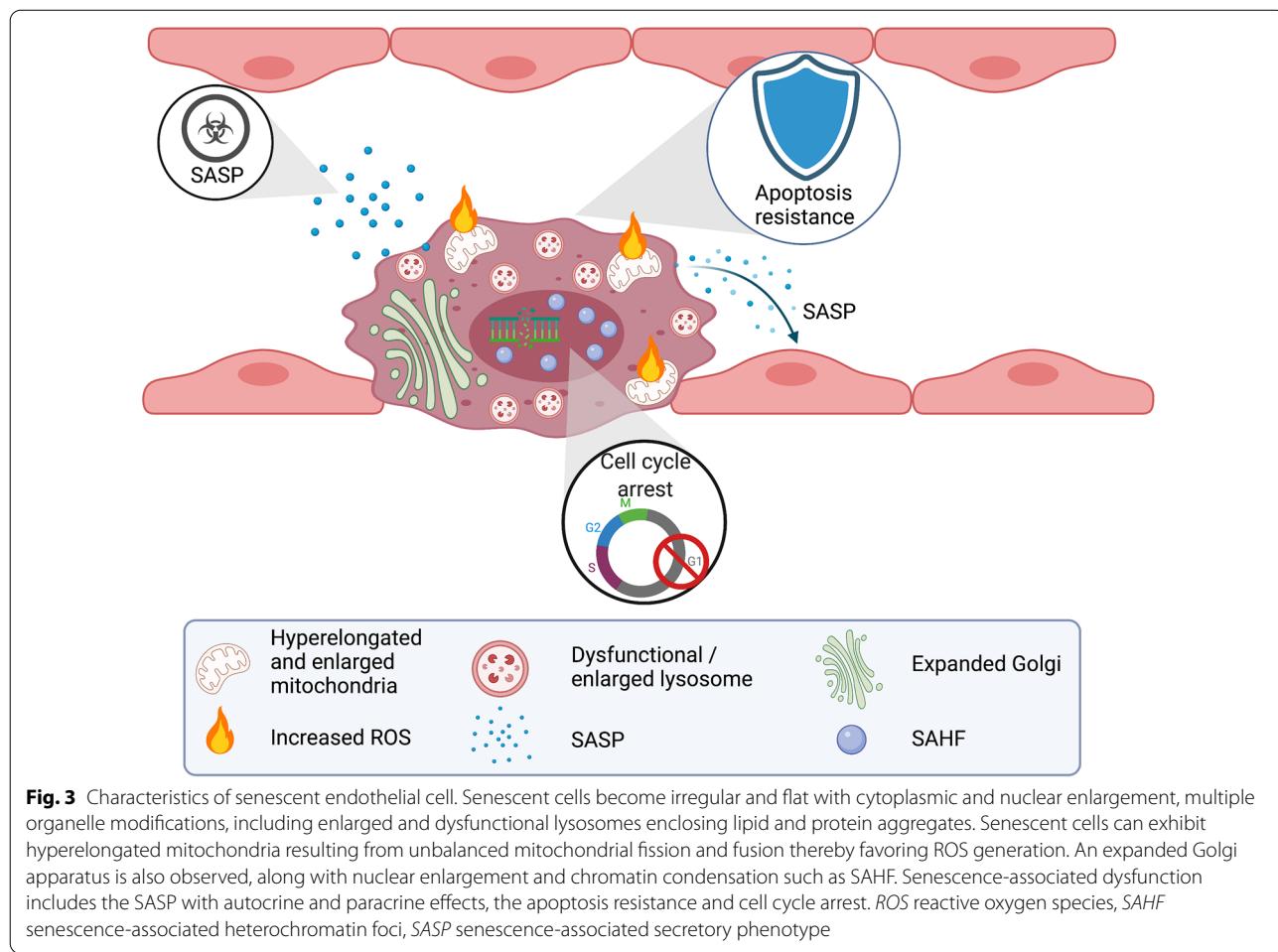
Table 1 Main endothelial SASP components

Main endothelial SASP components	
Pro-inflammatory mediators	TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, CSFs
Pro-inflammatory chemokines	CXCL-1, CXCL-8, CCL-2
Proteases and mediators of tissue remodeling	MMPs, PAI-1
Growth factors	VEGF, EGF, IGFBPs

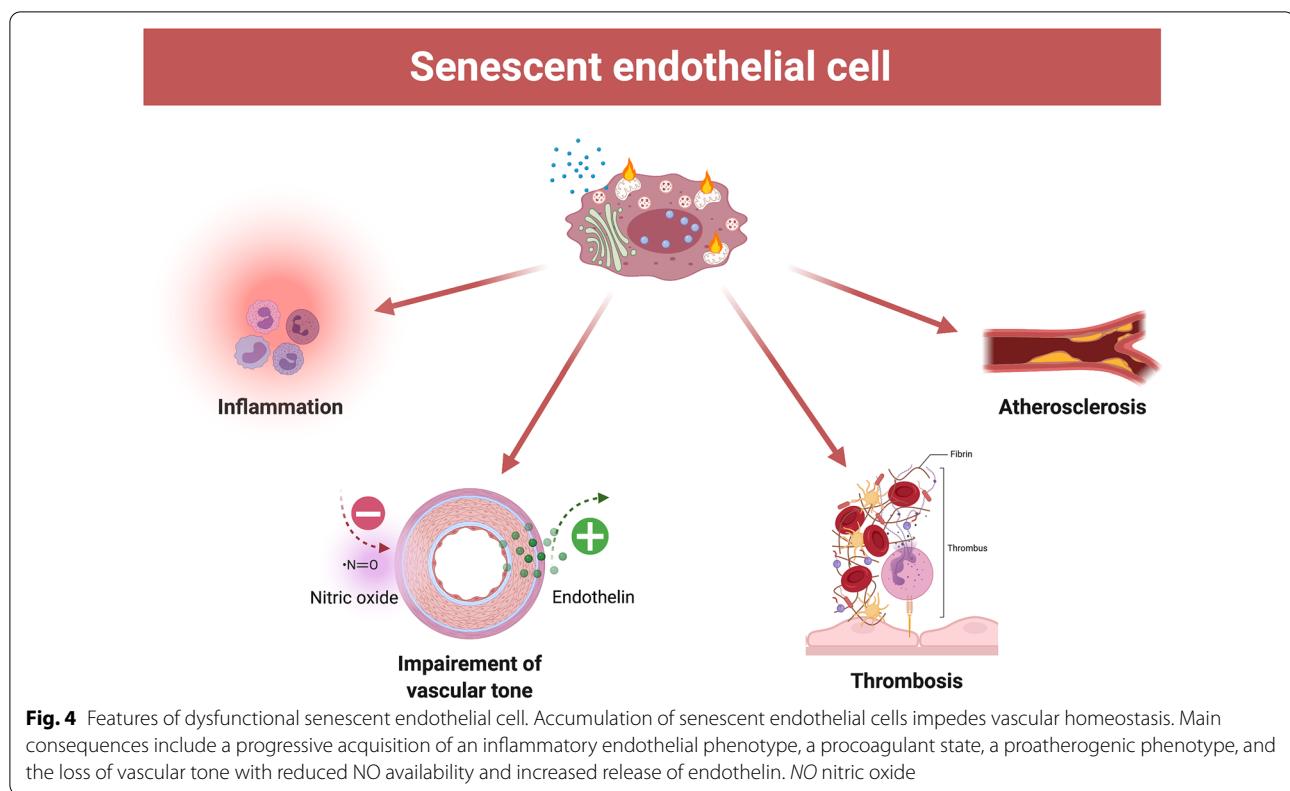
TNF- α tumor necrosis factor alpha, *TGF- β* transforming growth factor beta, *IL-1* interleukin-1, *IL-6* interleukin-6, *CSFs* colony-stimulating factor, *CXCL-1* chemokine (C-X-C motif) ligand-1, *CXCL-8* chemokine (C-X-C motif) ligand-8, *CCL-2* C-C motif chemokine ligand 2, *MMPs* matrix metalloproteinases, *PAI-1* plasminogen activator inhibitor-1, *VEGF* vascular endothelial growth factor, *EGF* epidermal growth factor, *IGFBPs* insulin-like growth factor-binding protein

What are the paths leading to cellular senescence?

One of the major discoveries of the early twenty-first century is that in addition to replicative senescence, cells can also undergo unplanned senescence when subjected to stressors. SIPS and replicative senescence share overlapping pathways with distinct checkpoints.



Hyperelongated and enlarged mitochondria	Dysfunctional / enlarged lysosome	Expanded Golgi
Increased ROS	SASP	SAHF



DNA damage response (DDR) is a major driver in both replicative senescence and SIPS, respectively, initiated by telomere shortening or different stressors (Fig. 5). In replicative senescence, telomeres via the telosome complex [72], prevent the DDR machinery from recognizing chromosome-free ends as double-strand breaks to be repaired, a potential threat leading to erroneous chromosome recombination or fusion events [73]. When telomeres become critically short, the protective telosome is no longer recruited to the DDR, thereby favoring senescence. The other senescence pathway, triggered by stressors, is controlled by the INK4/ARF locus, extensively studied in oncogene-induced senescence (OIS) [74].

p53 is the main checkpoint in the DDR pathway. It can be activated directly by ATM/ATR or indirectly via the activation of checkpoint kinase 1 (Chk1) and checkpoint kinase 2 (Chk2), two serine/threonine-specific protein kinases (Fig. 5).

In SIPS, p53 can be activated via ARF (ADP ribosylation factor), a small GTPase of the RAS superfamily family, which blocks the activity of MDM2, an ubiquitin ligase leading to p53 degradation. p53 induces the transcription of the downstream cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which blocks CDK2 activity, resulting in hypophosphorylated retinoblastoma protein (pRB). The binding of hypophosphorylated pRB to the transcription

factor E2F will further suppress the expression of S-phase genes leading to a cell cycle arrest [75].

The activation of the INK4/ARF locus not only triggers ARF, but also p16, a member of the INK4 cell cycle inhibitors. p16 directly binds to the cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6, thereby blocking the downstream phosphorylation of the pRB tumor suppressor.

Ongoing investigations on the activation of the INK4/ARF locus point at the formation of the polycomb group (PcG) proteins complexes (PRC 1 and PRC 2) as the main initiator of the response to stressors. PcG proteins act as transcriptional repressors through the trimethylation or mono-ubiquitination of histones H3 and H2A, thereby controlling the expression of genes involved in DNA repair at specific.

How is PcG altered during senescence is yet not completely understood, recent data pointing at a possible implication of silencing miRNA [76]. Strikingly, in various cell models of senescence, the interaction of PcG with the INK4/ARF locus appears also under epigenetic control via long non-coding (Lnc) RNAs serving as scaffolds, such as ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus) [77–79].

Amplification of the senescent response occurs through heterochromatinization of cell-cycle genes in SAHF (Fig. 3) [80] and via the SASP-driven production

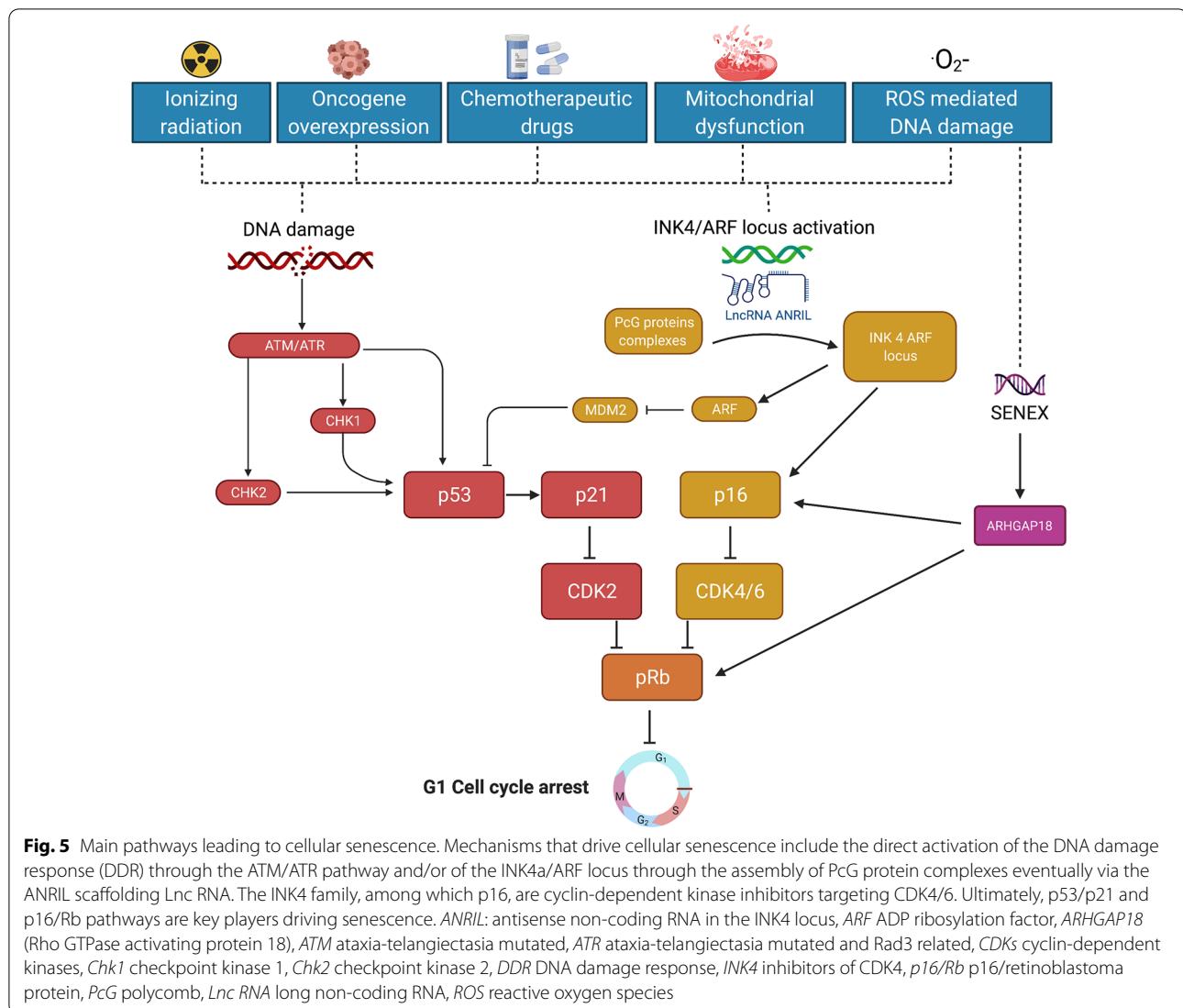


Fig. 5 Main pathways leading to cellular senescence. Mechanisms that drive cellular senescence include the direct activation of the DNA damage response (DDR) through the ATM/ATR pathway and/or the INK4a/ARF locus through the assembly of Pcg protein complexes eventually via the ANRIL scaffolding lnc RNA. The INK4 family, among which p16, are cyclin-dependent kinase inhibitors targeting CDK4/6. Ultimately, p53/p21 and p16/Rb pathways are key players driving senescence. *ANRIL*: antisense non-coding RNA in the INK4 locus, *ARF* ADP ribosylation factor, *ARHGAP18* (Rho GTPase activating protein 18), *ATM* ataxia-telangiectasia mutated, *ATR* ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related, *CDKs* cyclin-dependent kinases, *Chk1* checkpoint kinase 1, *Chk2* checkpoint kinase 2, *DDR* DNA damage response, *INK4* inhibitors of CDK4, *p16/Rb* p16/retinoblastoma protein, *Pcg* polycomb, *Lnc RNA* long non-coding RNA, *ROS* reactive oxygen species

of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 that favor the cell-cycle arrest [81].

Stress induces premature senescence: SIPS

In 2000, Toussaint and colleagues reported a pioneer observation that cultured human fibroblasts robustly entered a senescence-like state several days after repeated exposure to mild treatment with *tert*-butylhydroperoxide with sublethal oxidative stress [82]. This work was then corroborated using sustained or repeated cell treatments by numerous chemical stressors like ethanol [83], chronic exposure to pollutants (cigarette smoke) or irradiation (UV-B light) [84]. SIPS is mainly initiated by DNA damage, DNA breaks activating the DDR pathway in the absence of telomere shortening [85].

Recent data have challenged the concept that SIPS is a telomere-independent process, distinct from replicative

senescence. Indeed, DNA damage during SIPS occurs randomly all over the genome including telomeres. However, whereas most of the DNA damage will be repaired within 24 h, telomeric regions will remain unrepairs for months, maintaining a sustained unresolved DNA damage [86]. Of note, this reveals that pathways leading to senescence, either premature or replicative, may at some point share intricate features. Recently, SENEX, an endothelial senescence-inducing gene, discovered as a result of serendipity, acting in response to H_2O_2 was shown to induce the p16/Rb pathway by up-regulating both p16 mRNA and protein together with a decrease in the hyperphosphorylated Rb protein level [87]. This gene does not alter the expression of either p53 or p21 nor affects telomere length pointing at a prevailing p16 pathway (Fig. 5).

Sepsis as a stress factor inducing premature senescence in several tissues

While pathophysiological mechanisms of sepsis are widely described in the elderly [88], this review will focus on sepsis-induced premature senescence.

Indeed, during the previous decade, several in vitro and in vivo studies have highlighted the association between sepsis and premature senescence (Table 2). In vitro, a single 24-h exposure to lipopolysaccharide (LPS) induces the senescence of type II pulmonary alveolar epithelial cells detectable after 7 days by SA- β -Gal activity with no telomere shortening [89]. Viruses are also septic stressors of pulmonary cells leading to elevated SA- β -Gal activity [90]. As evidenced in human pneumocyte type II cells (A549) and nasopharyngeal cells (HEp-2), the human respiratory syncytial virus (hRSV) causes strong ATM/p53/p21-dependent activation of the DDR, as well as the nuclear recruitment of phosphorylated γ -H2AX, a typical marker of the DDR response. Same effect has been demonstrated in murine Neuro2a cells on which the Avian H7N9 influenza virus induces cellular senescence in vitro [91]. Premature LPS-induced senescence has been also characterized in murine BV2 microglia cells [92], in adipocytes progenitors [93] or dental pulp stem cells [94].

In vivo, data confirming sepsis-induced premature senescence in young individuals are scarce. In a murine endotoxemia model a ~20% reduction in telomere length by qPCR was reported in spleen and kidney, 48 h after intraperitoneal injection of a high LPS concentration, while no other senescence marker was assessed [95]. More in-depth characterization was brought by elevated p16 and SA- β -Gal activity in lung tissue measured after 24 h in a two-hit septic mice model using CLP followed by sublethal *Pseudomonas aeruginosa* infection [96]. Additionally, airway epithelium senescence was also evidenced by γ -H2AX and CDKN2A labeling from day 4 to day 30 in hRSV-infected mice [90]. Same effect has been demonstrated in murine Neuro2a cells in vitro on which the H7N9 influenza virus induces cellular senescence.

In a rat model, we recently evidenced that CLP-induced sepsis causes a time-dependent arterial accumulation of senescence markers, peaking at 3 months post-induction and associated with vascular dysfunction [34].

To date, the only data describing accelerated senescence after sepsis in human were reported by Oliveira et al. Their analysis showed that telomere length, from blood samples of patients who developed sepsis in the trauma department, was significantly shortened 1 week after sepsis initiation [95].

Altogether, these observations strongly suggest that a senescent shift may progressively occur after sepsis as an ongoing process thereby questioning the timescale to study consecutive tissue damages.

Next-generation therapies targeting senescent cells for post-sepsis cardiovascular disorders

Many pharmacological studies have indicated that specifically eliminating senescent cells ("senolysis") by using senolytic drugs or by suppressing the senescent phenotype with senostatics may contribute to reversal of the aging phenotype (Fig. 6) [97, 98] and should be considered as a next-generation therapy for atherosclerotic disorders [99, 100]. These senotherapies are usually non-specific and do target multiple pathways.

Senolytics

In a major 2018 study, Kirkland and his colleagues at the Mayo Clinic provided a proof-of-concept evidence that transplanted senescent cells can cause physical disability and reduced lifespan in young and middle-aged mice. They also demonstrated that intermittent oral administration of a senolytic cocktail of dasatinib and quercetin significantly reversed the effect of senescent cells and increased median survival by 36% [98].

To date, one main senolytic strategy is to shift the senescent cells into apoptotic ones by triggering the member of the BCL-2 family [101], most of them being up-regulated in senescent cells [102]. Indeed, the most studied senolytics are dasatinib (a pan inhibitor of tyrosine kinases), quercetin (a flavonoid present in many fruits and vegetables with antioxidant and anti-inflammatory properties, mainly targeting PI3-kinase and serpins) and navitoclax previously named ABT263 (a mimetic of the BH-3 domain of anti-apoptotic proteins BCL-2 and Bcl-xL) [62, 103, 104]. Navitoclax would appear promising in the prevention of potential sepsis-induced cardiovascular disorders, since it was demonstrated to efficiently reduced plaque burden, number and average size in atherosclerosis-prone mice with established senescence [99]. Similarly, dasatinib and quercetin were shown to prevent vasomotor dysfunction in aged mice and reduce senescence burden and arterial plaque calcification in an ApoE^{-/-} high-fat diet murine model [105]. While targeting BCL-2 may lead to unwanted cellular triggering and toxicity [106], senescence-specific killing compound 1 (SSK1) would better target senescent cells with low impact on the self-renewal of target cells. This new senolytic prodrug is specifically cleaved by the enhanced lysosomal β -galactosidase activity characterizing senescent cells and transformed into cytotoxic gemcitabine inducing apoptosis, as demonstrated in mice and human ECs in vitro [107].

In 2019, first evidence that senolytics (dasatinib and quercetin) are safe and efficient in humans was published [108]. Later the same year, the same team from the Mayo clinic reported for the first time in human that these senolytics reduced key circulating SASP factors (IL and

Table 2 Studies of sepsis-induced senescence in cell, preclinical and clinical studies

Cells	Species of origin	Sepsis model	Analysis time points	Results	References
In vitro					
Microglia cells (Bv2 cell)	C57BL/6 mouse	10 ng/ml LPS stimulation: once 3 times; once every 48 h for 4 h each 6 times; once every 24 h for 4 h each	After 1, 6 or 12 days	<ul style="list-style-type: none"> Kinetics (6–12 days): •Inhibition of cell proliferation •Elevated degree of: <ul style="list-style-type: none"> – Cell cycle arrest in the G0/G1 phase – The aging associated proteins p53 – Senescence-associated β-galactosidase activity – Senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) 	[92]
Type II pulmonary alveolar epithelial cells (A549 immortalized cells)	Human	5–20 μ g/ml LPS single stimulation for 24 h	After 1, 3 or 7 days	<ul style="list-style-type: none"> Elevated degree of: <ul style="list-style-type: none"> – Senescence-associated β-galactosidase activity •No decrease in telomere length 	[89]
Dental pulp stem cells (DPSCs)	Human	10 ng/ml <i>Escherichia coli</i> PS (serotype 011: B4) stimulation: once for 6 h 3 times; once every 48 h for 6 h each 6 times; once every 24 h for 6 h each	After 1 h	<ul style="list-style-type: none"> Senescence-like morphology •Inhibition of cell proliferation •Elevated degree of: <ul style="list-style-type: none"> – Cell cycle arrest in the G1 phase – Senescence-associated β-galactosidase activity – The aging associated p16^{INK4A} – of p16^{INK4A} mRNA •Knockdown of p16^{INK4A} expression by siRNA transfection reversed the senescent features of LPS-treated DPSCs 	[94]
Adipocyte progenitors (stromal-vascular cells)	C57BL/6 mouse	0.2 μ g/ml LPS stimulation for 24 h	After 3 days	<ul style="list-style-type: none"> Elevated degree of: <ul style="list-style-type: none"> – p53 phosphorylation – Senescence-associated β-galactosidase activity – β-galactosidase-positive cells – mRNA indicating significant SAPS (TNFα, IL-1β, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and VEGFα) •No accelerate telomere shortening 	[93]

Table 2 (continued)

Cells	Species of origin	Sepsis model	Analysis time points	Results	References
Type II pulmonary-alveolar epithelial cells (A549 immortalized cells)	Human	Human respiratory syncytial virus (<i>Pneumovirus</i> genus of the <i>Parmyoviridae</i> family)	After 48 h	• Senescence-associated secretory phenotype (SASP) in supernatant • Elevated degree of: – The aging associated proteins p53 – Senescence-associated β-galactosidase activity	[90]
Human naso-pharyngeal cells (HEp-2 immortalized cells)				• Senescent cell-like morphology • Increase senescence-associated β-galactosidase activity	[91]
Neuroblastoma	Mouse	H7N9 <i>Influenza A</i> Virus	After 3 days	• Dose-dependent telomere shortening in the spleen and liver at 48 h (but not at 1 h) measured by quantitative polymerase chain reaction (PCR) • No difference in telomerase expression in kidney homogenates 1 h after LPS	[92]
In vivo				• Upregulation of: – Senescence-associated biomarker p16 ^{INK4a} – Senescence-associated β-galactosidase activity	[93]
Blood, spleen and kidney samples (unspecified cell type)	Young male BALB/c mice	15 mg/kg LPS intraperitoneal injection	After 1 h or 48 h	• Upregulation in kidney homogenates 1 h after LPS	[94]
Lung tissue (unspecified cell type)	Young male C57BL/6 mice	Two-hit mouse model using CLP followed by sublethal <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection 4 h later	24 h after <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection	• Upregulation of: – The aging associated proteins p53, p21 and p16 – The aging associated proteins p53 localized in the endothelium	[95]
Vascular tissue	Young Wistar male rats	CLP	3, 7 or 90 days after CLP		[34]

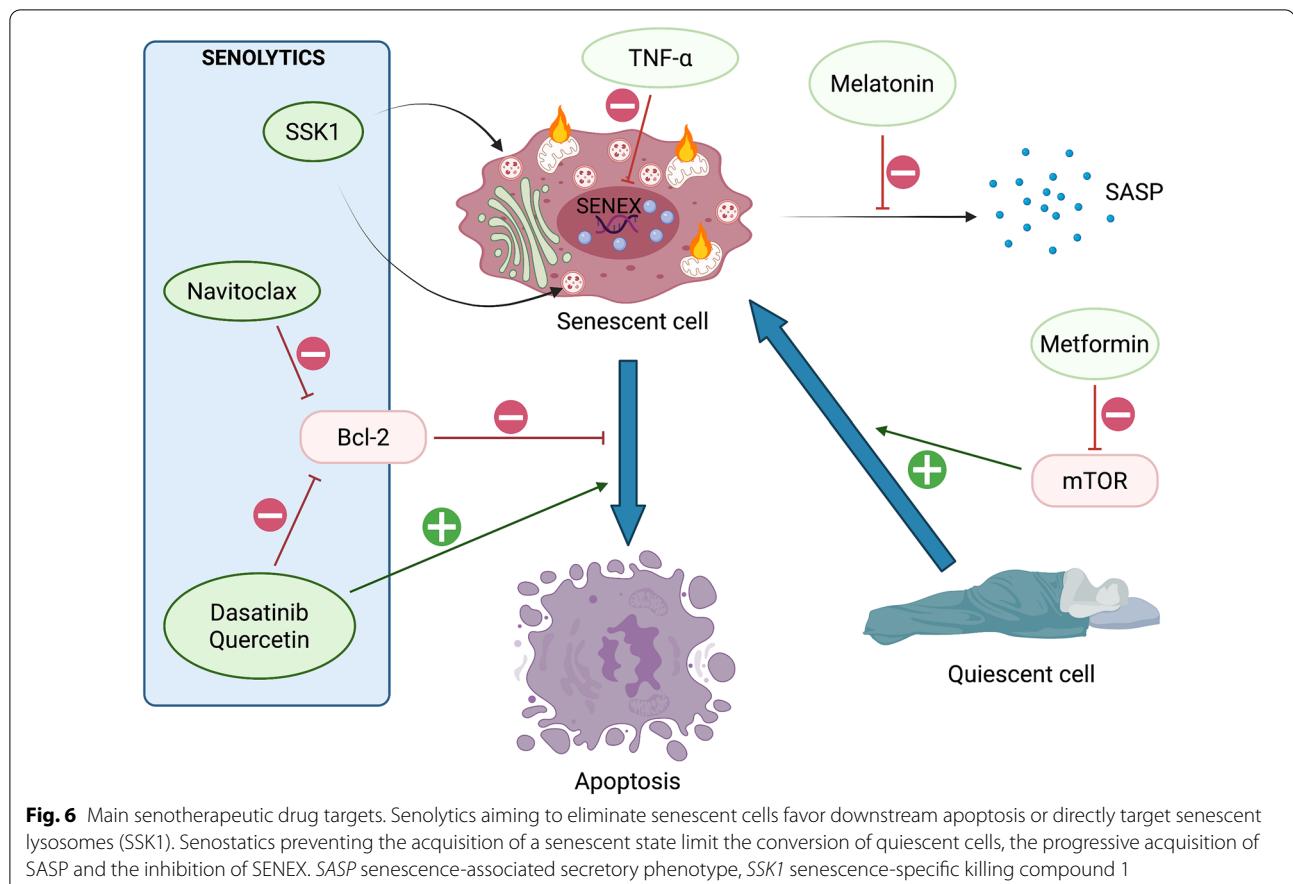


Fig. 6 Main senotherapeutic drug targets. Senolytics aiming to eliminate senescent cells favor downstream apoptosis or directly target senescent lysosomes (SSK1). Senostatics preventing the acquisition of a senescent state limit the conversion of quiescent cells, the progressive acquisition of SASP and the inhibition of SENEX. SASP senescence-associated secretory phenotype, SSK1 senescence-specific killing compound 1

MMP), but also senescence markers (p21, p16 and SA- β -Gal activity) in adipose tissue biopsies [103].

Senostatics

Inhibiting SASP, via melanin for example [109], without causing adverse effects is challenging because many pathways that may activate SASP (such as NF- κ B or mTOR) are also involved in critical processes such as tumor surveillance or the immune system [110].

Interestingly, SENEX is a TNF α -sensitive gene and in vitro treatment by low concentration of TNF α prompts the endothelial downregulation of this gene leading to apoptosis, confirming SENEX as a promising target in the early prevention of sepsis-induced endothelial senescence [87].

Another vascular protective strategy would be to prevent the shift from endothelial quiescence to senescence by inhibiting the mTOR pathway. Confirmation was brought in atheroprone ApoE $^{-/-}$ adult mice treated by metformin that inhibited endothelial cell senescence and thus contributed to partially decreased atherosclerotic plaque formation [111]. This is of particular interest because metformin is also known to exert

protective effect on endothelial cells in sepsis via adenosine monophosphate-activated protein kinase AMPK activation (which exert inhibition of mTOR) [112].

Conclusion

Post-septic cardiovascular disease, as a part of the morbidity and mortality observed in the post-sepsis syndrome, is one of the emerging health issues. Premature senescence of endothelium and vascular tissue appears to be one of the mechanisms involved in the accelerated atherogenesis in sepsis survivors. Targeting pro-senescent endothelial cells with senotherapy in sepsis seems promising to delay endothelial senescence and improve vascular health and long-term outcomes after sepsis.

Abbreviations

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated; ATR: Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related; Chk: Checkpoint kinase; CLP: Cecal ligation and puncture; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; DCR2: Decoy receptor 2; DDR: DNA damage response; DNA: Deoxyribonucleic acid; EC: Endothelial cell; ET-1: Endothelin-1; hRSV: Human respiratory syncytial virus; ICU: Intensive care unit; IL: Interleukin; Ldlr $^{-/-}$: Low-density lipoprotein receptor-deficient; LPS: Lipopolysaccharide; MACE: Major adverse cardiovascular events; MMP: Matrix metalloproteinase; NO: Nitric oxide; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; pRB:

Retinoblastoma protein; ROS: Reactive oxygen species; SA- β -Gal: Senescence-associated β -galactosidase; SAHF: Senescence-associated heterochromatic foci; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; SIPS: Stress-induced premature senescence; SSK: Senescence-specific killing compound; US\$: United States dollar; USA: United States of America; UV: Ultraviolet; VIS: Virus-induced senescence; WHO: World health organization.

Acknowledgements

None.

Authors' contributions

HM, VSK, FT, FM wrote the manuscript, reviewed and edited the article before submission. HM created the figure with BioRender.com (<https://biorender.com/>) subscribed to HM. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

No funding to declare.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

All authors hereby consent to the publication.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Glossary

Apoptosis is a form of programmed cell death with a key role in the removal of potentially harmful and damaged cells such as precancerous or virus-infected cells. Apoptotic cells are characterized by DNA fragmentation, membrane blebbing, formation of apoptotic bodies, and activation of proteolytic enzymes such as caspases.

Atherosclerosis a chronic inflammatory disease of large and medium-sized arteries that lead to the formation of fibro-fatty lesions in the artery wall predominantly at sites of disturbed flow where endothelial senescence emerges.

Cecal ligation and puncture rat model of sepsis. CLP-rats undergo a laparotomy, a ligation and puncture of the cecum, which is then reintegrated in the peritoneum. Rats develop peritonitis within few hours, resulting in sepsis or septic shock. The severity of sepsis can be modulated via the number and size of the punctures.

DNA damage response (DDR) involves a complex network of genes that can promote cell-cycle arrest to repair DNA lesions induced by different kind of stress. DDR can induce cell senescence in case of irreparable DNA damage.

Endothelium monolayer-type of epithelium lining the interior of the heart and blood vessels. Under normal circumstance, the endothelial surface is a protective barrier which displays antiaggregant, anticoagulant and anti-inflammatory features.

H_2O_2 Hydrogen peroxide is part of the reactive oxygen species, a group of molecules produced in the cell through metabolism of oxygen. It is one major contributor to oxidative damage.

Inflammageing a condition that progressively develops with age and characterized by modification of the immune system and elevated levels of blood inflammatory markers that favor high susceptibility to chronic morbidity, invalidity, frailty, and premature death.

Lipopopolysaccharide (LPS) essential component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Frequently used to mimic the initial acute inflammatory response to sepsis, both *in vivo* and *ex vivo*.

Major adverse cardiovascular events	is a composite endpoint frequently used in cardiovascular research. First defined as a composite of non-fatal myocardial infarction, non-fatal stroke, and cardiovascular death (classical 3-point MACE). It can also include hospitalization for heart failure in some studies (4-P MACE). Detection and treatment of the risk factors for MACE are critical to improve health and longevity.	Telosome	consists of telomere-specific proteins involved in the protection of telomere, preventing from degradation and activation of unwanted repair systems. Also named “the shelterin complex”, it plays a crucial role in replicative senescence and ageing-related pathologies.
Post-sepsis syndrome	Consists of immunological, cardiovascular, and cognitive deficits persisting long after hospital discharge, resulting in more frequent rehospitalizations due to recurrent sepsis, altered quality of life, and increased morbidity and mortality. It affects up to 50% of sepsis survivors.		
Senescence-associated heterochromatic foci (SAHF)	are specialized domains of facultative heterochromatin contributing to silencing of proliferation-promoting genes (such as E2F target genes) in senescent cells.		
Senescence associated secretory phenotype (SASP)	defines the ability of senescent cells to express and secrete a broad range of extracellular modulators including cytokines, chemokines, proteases, growth factors and lipids. SASP can mediate tumor suppression and wound healing but also chronic inflammation and age-related diseases.		
Sepsis	dysregulated host response to an infection, resulting in life-threatening organ dysfunction.		
Septic shock	sepsis with acute circulatory failure, defined by low blood pressure requiring vasopressors and by hyperlactatemia, reflecting tissue hypoxia.		
Telomere	specific DNA–protein structures found at both ends of each chromosome, protecting genome from nucleolytic degradation, unnecessary recombination, repair, and interchromosomal fusion. With replication cycles telomeres grow shorter or dysfunctional that could lead to DNA damage response.		

Author details

¹INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), CRBS (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg), FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), University of Strasbourg, Strasbourg, France. ²Department of Intensive Care (Service de Médecine Intensive-Réanimation), Nouvel Hôpital Civil, Hôpital Universitaire de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France. ³Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Received: 24 July 2021 Accepted: 8 October 2021

Published online: 01 December 2021

References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10.
2. Cleere-Jehl R, Mariotte A, Meziani F, Bahram S, Georgel P, Helms J. JAK-STAT targeting offers novel therapeutic opportunities in sepsis. *Trends Mol Med*. 2020;26(11):987–1002.
3. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–11.
4. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *N Engl J Med*. 2017;377(5):414–7.
5. Preau S, Vodovar D, Jung B, Lancel S, Zafrani L, Flares A, et al. Energetic dysfunction in sepsis: a narrative review. *Ann Intensive Care*. 2021;11(1):104.
6. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21):2323–9.
7. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23(1):196.
8. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259–72.
9. Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding long-term outcomes following sepsis: implications and challenges. *Curr Infect Dis Rep*. 2016;18(1):37.
10. Dupuis C, Bouadma L, Ruckly S, Perozziello A, Van-Gysel D, Mageau A, et al. Sepsis and septic shock in France: incidences, outcomes and costs of care. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):145.
11. van der Slikke EC, An AY, Hancock REW, Bouma HR. Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. *EBioMedicine*. 2020;61:103044.
12. Zorio V, Venet F, Delwarde B, Floccard B, Marcotte G, Textoris J, et al. Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):80.
13. Goodwin AJ, Rice DA, Simpson KN, Ford DW. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*. 2015;43(4):738–46.

14. Tiru B, DiNino EK, Orenstein A, Mailloux PT, Pesaturo A, Gupta A, et al. The economic and humanistic burden of severe sepsis. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(9):925–37.
15. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ*. 2016;353:i2375.
16. Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, Angus DC, Chirinos JA, Chang CC, et al. Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA*. 2015;313(3):264–74.
17. Yende S, Linde-Zwirble W, Mayr F, Weissfeld LA, Reis S, Angus DC. Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(9):1065–74.
18. Kosyakovsky LB, Angriman F, Katz E, Adhikari NK, Godoy LC, Marshall JC, et al. Association between sepsis survivorship and long-term cardiovascular outcomes in adults: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2021;47:931–42.
19. Mankowski RT, Yende S, Angus DC. Long-term impact of sepsis on cardiovascular health. *Intensive Care Med*. 2019;45(1):78–81.
20. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial, “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res*. 1996;32(5):822–9.
21. Musher DM, Abers MS, Corrales-Medina VF. Acute infection and myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2019;380(2):171–6.
22. Dolmatova EV, Wang K, Mandavilli R, Griendling KK. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovasc Res*. 2021;117(1):60–73.
23. Dewitte A, Lepreux S, Villeneuve J, Rigothier C, Combe C, Ouattara A, et al. Blood platelets and sepsis pathophysiology: a new therapeutic prospect in critically [corrected] ill patients? *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):115.
24. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):117.
25. Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J*. 2001;15(2):458–66.
26. Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):985–95.
27. Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int*. 2004;65(2):510–20.
28. Yang D, McCrann DJ, Nguyen H, St Hilaire C, DePinho RA, Jones MR, et al. Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence. *Aging Cell*. 2007;6(2):257–60.
29. Rajapakse AG, Yeruri G, Carvas JM, Stein S, Matter CM, Scerri I, et al. Hyperactive SGK1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e19237.
30. Lin JR, Shen WL, Yan C, Gao PJ. Downregulation of dynamin-related protein 1 contributes to impaired autophagic flux and angiogenic function in senescent endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(6):1413–22.
31. Morgan RG, Ives SJ, Lesniewski LA, Cawthon RM, Andtbacka RH, Noyes RD, et al. Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(2):H251–8.
32. Sun Y, Coppe JP, Lam EW. Cellular senescence: the sought or the unwanted? *Trends Mol Med*. 2018;24(10):871–85.
33. Kaynar AM, Yende S, Zhu L, Frederick DR, Chambers R, Burton CL, et al. Effects of intra-abdominal sepsis on atherosclerosis in mice. *Crit Care*. 2014;18(5):469.
34. Merdji H, Kassem M, Chomel L, Clere-Jehl R, Helms J, Kurihara K, et al. Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: a new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications. *Vascu Pharmacol*. 2021.
35. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):505–22.
36. Borodkina AV, Deryabin PI, Giukova AA, Nikolsky NN. “Social Life” of senescent cells: what is SASP and why study it? *Acta Naturae*. 2018;10(1):4–14.
37. Wang M, Kim SH, Monticone RE, Lakatta EG. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension*. 2015;65(4):698–703.
38. Burstein SM, Finch CE. Longevity examined: an ancient Greek’s very modern views on ageing. *Nature*. 2018;560(7719):430.
39. Faragher RG. Should we treat aging as a disease? The consequences and dangers of miscategorisation. *Front Genet*. 2015;6:171.
40. Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729–40.
41. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585–621.
42. Kelley WJ, Zemans RL, Goldstein DR. Cellular senescence: friend or foe to respiratory viral infections? *Eur Respir J*. 2020;56(6):2002708.
43. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):718–35.
44. Song S, Lam EW, Tchikonia T, Kirkland JL, Sun Y. Senescent cells: emerging targets for human aging and age-related diseases. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(7):578–92.
45. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 2000;35(8):927–45.
46. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*. 2007;371:21–31.
47. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187–95.
48. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113(Pt 20):3613–22.
49. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9363–7.
50. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798–806.
51. Dimri GP, Campisi J. Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:67–73.
52. Dimri GP, Testori A, Acosta M, Campisi J. Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol Signals*. 1996;5(3):154–62.
53. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(6):344–52.
54. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99–118.
55. Kuilman T, Peepre DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):81–94.
56. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol*. 2020;18(1):e3000599.
57. Tchikonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013;123(3):966–72.
58. Cuollo L, Antonangioli F, Santoni A, Soriano A. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases. *Biology (Basel)*. 2020;9(12):485.
59. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res*. 1995;55(11):2284–92.
60. Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(15):1695–706.
61. Rochette PJ, Brash DE. Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(4):207–14.

62. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 2016;7:11190.

63. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010–4.

64. Uryga AK, Bennett MR. Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *J Physiol.* 2016;594(8):2115–24.

65. Olmos G, Martinez-Miguel P, Alcalde-Estevez E, Medrano D, Sosa P, Rodriguez-Manas L, et al. Hyperphosphatemia induces senescence in human endothelial cells by increasing endothelin-1 production. *Aging Cell.* 2017;16(6):1300–12.

66. Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol Genomics.* 2004;17(1):21–30.

67. Ungvari Z, Tucek Z, Sosnowska D, Toth P, Gautam T, Podlutsky A, et al. Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebromicrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68(8):877–91.

68. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):122–35.

69. Khan SY, Awad EM, Oszwald A, Mayr M, Yin X, Waltenberger B, et al. Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNFalpha can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. *Sci Rep.* 2017;7:39501.

70. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism. *Physiol Rev.* 2018;98(1):3–58.

71. Katsuumi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:18.

72. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100–10.

73. Childs BG, Li H, van Deursen JM. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1217–28.

74. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006;127(2):265–75.

75. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):518–28.

76. Guajardo L, Aguilera R, Bustos FJ, Nardocci G, Gutierrez RA, van Zundert B, et al. Downregulation of the polycomb-associated methyltransferase Ezh2 during maturation of hippocampal neurons is mediated by MicroRNAs Let-7 and miR-124. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8472.

77. LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. *Mol Cancer Res.* 2014;12(2):167–83.

78. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* 2010;38(5):662–74.

79. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene.* 2011;30(16):1956–62.

80. Aird KM, Zhang R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol.* 2013;965:185–96.

81. Jin B, Wang Y, Wu CL, Liu KY, Chen H, Mao ZB. PIM-1 modulates cellular senescence and links IL-6 signaling to heterochromatin formation. *Aging Cell.* 2014;13(5):879–89.

82. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonas ES, Frippiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):361–73.

83. Dumont P, Chainiaux F, Eliaers F, Petropoulou C, Remacle J, Koch-Brandt C, et al. Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones.* 2002;7(1):23–35.

84. Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 4):743–58.

85. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2003;5(8):741–7.

86. Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun.* 2012;3:708.

87. Coleman PR, Hahn CN, Grimshaw M, Lu Y, Li X, Brautigan PJ, et al. Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood.* 2010;116(19):4016–24.

88. Esme M, Topeli A, Yavuz BB, Akova M. Infections in the elderly critically-ill patients. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:118.

89. Kim CO, Huh AJ, Han SH, Kim JM. Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells. *Arch Gerontol Geriatr.* 2012;54(2):e35–41.

90. Martinez I, Garcia-Carpizo V, Guijarro T, Garcia-Gomez A, Navarro D, Aranda A, et al. Induction of DNA double-strand breaks and cellular senescence by human respiratory syncytial virus. *Virulence.* 2016;7(4):427–42.

91. Yan Y, Du Y, Zheng H, Wang G, Li R, Chen J, et al. NS1 of H7N9 influenza A virus induces NO-mediated cellular senescence in Neuro2a cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(4):1369–80.

92. Yu HM, Zhao YM, Luo XG, Feng Y, Ren Y, Shang H, et al. Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells. *NeuroimmunoModulation.* 2012;19(2):131–6.

93. Zhao M, Chen X. Effect of lipopolysaccharides on adipogenic potential and premature senescence of adipocyte progenitors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(4):E334–44.

94. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Tan W, Huang D, et al. Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res.* 2014;356(2):369–80.

95. Oliveira NM, Rios ECS, de Lima TM, Victorino VJ, Barbeiro H, Pinheiro da Silva F, et al. Sepsis induces telomere shortening: a potential mechanism responsible for delayed pathophysiological events in sepsis survivors? *Mol Med.* 2017;22:886–91.

96. Li H, Luo YF, Wang YS, Xiao YL, Cai HR, Xie CM. *Pseudomonas aeruginosa* induces cellular senescence in lung tissue at the early stage of two-hit septic mice. *Pathog Dis.* 2018;76(9).

97. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasser NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232–6.

98. Xu M, Pirtskhalaia T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018;24(8):1246–56.

99. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016;354(6311):472–7.

100. Dookun E, Passos JF, Arthur HM, Richardson GD. Therapeutic potential of senolytics in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2020.

101. Pignolo RJ, Passos JF, Khosla S, Tchkonia T, Kirkland JL. Reducing senescent cell burden in aging and disease. *Trends Mol Med.* 2020;26(7):630–8.

102. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derkx KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell.* 2017;169(1):132–47 e16.

103. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine.* 2019;47:446–56.

104. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016;22(1):78–83.

105. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalaia T, Thalji NM, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell.* 2016;15(5):973–7.

106. Carpenter VJ, Saleh T, Gewirtz DA. Senolytics for cancer therapy: is all that glitters really gold? *Cancers (Basel).* 2021;13(4):723.

107. Cai Y, Zhou H, Zhu Y, Sun Q, Ji Y, Xue A, et al. Elimination of senescent cells by beta-galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res.* 2020;30(7):574–89.
108. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*. 2019;40:554–63.
109. Yu S, Wang X, Geng P, Tang X, Xiang L, Lu X, et al. Melatonin regulates PARP1 to control the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fetal lung fibroblast cells. *J Pineal Res.* 2017;63(1):e12405.
110. Chen MS, Lee RT, Garber JC. Senescence mechanisms and targets in the heart. *Cardiovasc Res.* 2021.
111. Karnewar S, Neeli PK, Panuganti D, Kotagiri S, Mallappa S, Jain N, et al. Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: relevance in age-associated vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt A):1115–28.
112. Castanares-Zapatero D, Bouleti C, Sommereyns C, Gerber B, Lecut C, Mathivet T, et al. Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: role of the alpha1AMP-activated protein kinase isoform. *Crit Care Med.* 2013;41(12):e411–22.

Publisher's Note

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

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

Discussion

Ce travail de thèse repose sur une démarche translationnelle et transdisciplinaire articulant recherche préclinique et clinique. Son but était de prendre notamment en compte de nouvelles connaissances issues de l'observation clinique pour poser de nouvelles hypothèses sur l'implication de la sénescence cellulaire prématurée induite par un état de choc septique. En nous appuyant sur l'observation des principales complications caractérisant le syndrome post-sepsis, nous avons centré notre étude sur le rôle de la sénescence associée à la dysfonction vasculaire et immunitaire résiduelles et leurs conséquences au long cours. En effet, une meilleure compréhension des implications physiopathologiques de la sénescence cellulaire est fondamentale pour pouvoir en dégager des perspectives de thérapies ciblées.

Sur le plan de l'observation clinique dans l'étude SeneShock, nous avons évalué la dysfonction endothéiale associée à la physiopathologie de la défaillance cardio-vasculaire post-septique d'une part et les variations des lymphocytes T CD8+ circulants d'autre part de manière à mieux comprendre la récurrence des complications infectieuses post-septiques dans l'analyse.

Devant la difficulté d'identifier la sénescence endothéiale et tissulaire *in situ* chez le patient, le choix méthodologique s'est porté sur l'identification et la mesure de marqueurs de la sénescence portés par les cellules endothéliales circulantes et la caractérisation in-vitro de leurs éventuelles propriétés effectrices dans un modèle cellulaire de sénescence induite utilisant des cellules endothéliales primaires de coronaires de porc. Ce modèle permet d'étudier une réponse endothéiale pro-coagulante, pro-inflammatoire et sénescente. La confirmation de la dysfonction vasculaire induite par la sénescence endothéiale a été obtenue dans un modèle animal de choc septique sur péritonite. Nous avons également complété l'étude par l'évaluation des interactions avec la matrice extracellulaire *in vivo*.

La première partie de notre travail a consisté à mettre au point un modèle cellulaire d'analyse de la survenue de la sénescence endothéiale de type SIPS en réponse aux stimuli mimant un sepsis.

Les difficultés de reproductibilité et de sensibilité du modèle in-vitro, confirment l'intérêt d'utiliser du sang total comme milieu de culture ou un mélange entre du milieu de culture standard et du sang. En effet, l'activation de cellules endothéliales par les bactéries Gram-négatif et Gram-positif nécessite le CD14, la fraction C5 du complément (Nymo et al., 2016) et la LBP dont une fraction au moins est libre et circulante (Stasi et al., 2017). D'autres

molécules pro-inflammatoires synthétisées en grande partie par les leucocytes lors de leur mise en contact avec des bactéries, tels le TNF et l'IL-1 β participent également à l'activation endothéliale.

A titre d'exemple, le CD14 existe sous deux formes, l'une membranaire (mCD14) exposée à la surface membranaire et l'autre sous une forme soluble (sCD14) (Zanoni & Granucci, 2013). Il faut cependant noter que la forme dite « soluble », dont les variations sont décrites dans la littérature, est le plus souvent une forme circulante soit effectivement soluble libérée par clivage de son ancre GPI, soit exposée par la membrane de microvésicules de monocytes et de granulocytes. Le CD14 soluble apparaît donc soit après l'excrétion de mCD14 ou est directement sécrété par les vésicules intracellulaires. Ce CD14 agit comme un corécepteur du récepteur TLR 4 associé à MD-2 pour la détection de LPS (Lloyd & Kubes, 2006; Pahwa et al., 2016). Cependant, l'affinité du CD14 pour le LPS est très largement supérieure en présence de la protéine LBP qui circule à forte concentration au cours de la phase aiguë du sepsis. La LBP est majoritairement synthétisée par les hépatocytes et minoritairement par les pneumocytes de type 2 (Geller et al., 1993).

Prendre en compte les variations des concentrations de ces médiateurs circulants dans les différentes phases du sepsis apparaît donc crucial pour l'étude in-vitro de la réponse endothéliale en contexte de stimulation endotoxique ou bactérienne. A tout le moins, ces études devraient utiliser les cofacteurs indispensables à l'activation des PRR tels CD14, la LBP ou la fraction C5 du complément, avec pour obstacle l'accès à des préparations hautement purifiées ou alternativement l'utilisation de sang comme additif au milieu (nécessitant alors une reproductibilité entre les lots).

De manière à mieux caractériser les différentes voies potentiellement impliquées dans l'accélération de la sénescence des cellules endothéliales en contexte de sepsis, nous avons envisagé d'incuber des cellules endothéliales avec des microparticules issues de patients en choc septique. Cette approche a permis à Abbas *et al.* de confirmer l'existence de microparticules prosénescentes circulantes chez les patients présentant un syndrome coronarien à la phase aiguë. La co-incubation a induit une sénescence accélérée des cellules endothéliales mise en évidence par une augmentation de l'activité de la SA- β -Gal ainsi qu'une surexpression des marqueurs p21 et p16. En utilisant des microparticules de volontaires sains, les auteurs ne mettaient pas en évidence de sénescence accélérée et l'effet était réduit après immuno-déplétion des microvésicules endothéliales (Abbas et al., 2017).

L'évaluation de l'autophagie endothéliale dans notre étude apporterait un éclairage sur le rôle du sepsis dans l'articulation entre sénescence et autophagie. En effet, les deux mécanismes sont intimement liés et connus pour moduler l'homéostasie cellulaire (Rajendran et al., 2019). L'altération de l'autophagie semble avoir un effet direct sur le déclenchement de la sénescence et de la quiescence, avec cependant une régulation complexe puisque les mécanismes d'autophagie peuvent être pro-sénescent ou anti-sénescent, en fonction du contexte. De plus, au niveau vasculaire, l'autophagie semble aussi jouer un rôle important dans l'athérogenèse (Vion et al., 2017). Un défaut d'autophagie est associé à une augmentation de la sénescence des cellules musculaires lisses qui se caractérise par l'acquisition d'un phénotype proche de la sénescence (Grootaert et al., 2015). Enfin, une stimulation de l'autophagie par le tréhalose, un sucre qui est aussi activateur de l'autophagie indépendant de la voie mTOR, permet d'améliorer la dysfonction endothéliale liée au vieillissement (LaRocca et al., 2012). Cette dysfonction endothéliale en partie médiée par un défaut d'autophagie semble d'ailleurs proche de la dysfonction endothéliale retrouvée dans notre modèle animal *via* l'évaluation de la vasoréactivité artérielle, trois mois après un choc septique.

La deuxième partie de notre travail a été conçue comme un outil de recherche préclinique pour évaluer l'impact à long terme du sepsis sur la fonction vasculaire en nous concentrant sur la sénescence comme l'un des mécanismes sous-jacents.

La principale nouvelle information est que le sepsis induit une dysfonction artérielle avec une acquisition *in situ*, dépendante du temps, d'un phénotype d'inflammation et de sénescence à la fois dans les artères de conduction (aorte) et de résistance (artère mésentérique), indiquant un effet systémique à long terme.

Nos résultats ont confirmé la survenue d'un stress inflammatoire et oxydant artériel induit par le sepsis dans la phase aiguë (Joffre et al., 2020; Kremer et al., 2011) et ont mis en évidence une activation vasculaire pro-inflammatoire persistante jusqu'à 3 mois. L'inflammation et le stress oxydant atteignaient des valeurs maximales à J7 et leurs marqueurs persistaient dans la paroi artérielle à 3 mois, confirmant l'hypothèse d'une inflammation artérielle persistante et de son potentiel impact sur l'athérosclérose induite par le sepsis (Back et al., 2019; Gager et al., 2020; Wolf & Ley, 2019). Les ROS étant connus comme des médiateurs de sénescence prématuée et réplicative des cellules endothéliales (Abbas et al., 2017; Burger et al., 2012; Khemais-Benkhiat et al., 2016), nous avons également étudié la SIPS.

La sénescence endothéliale est un marqueur précoce des sites prédisposés à la formation de lésions athéromateuses, ce qui suggère l'implication potentielle de la SIPS dans l'initiation et la progression de l'athérogenèse (Warboys et al., 2014). Des données de la littérature chez l'homme montrent en outre p53 et p21 comme des marqueurs de la sénescence liée au vieillissement dans les artères de patients âgés (Morgan et al., 2013). Les données retrouvées dans notre étude soutiennent l'hypothèse que le sepsis déclenche l'expression prématuée de facteurs de transcription clés impliqués dans la sénescence : p53, p21 et p16 sont surexprimés dès J7 dans des segments d'aorte abdominale et de crosse aortique chez les rats septiques. La surexpression de p53 et de p16 en aval était encore plus élevée à J90 comparativement, suggérant une amplification au fil du temps. Il est intéressant de noter que la surexpression de p53 visualisée en microscopie confocale était localisée dans la couche endothéliale, indiquant ainsi l'induction d'une sénescence endothéliale pendant le choc septique. Par ailleurs, il est intéressant de noter que comme d'autres travaux l'ont rapporté (Childs et al., 2014; Hotchkiss et al., 2002), l'apoptose au niveau vasculaire est restée mineure.

Étant donné que les cellules endothéliales sénescentes acquièrent progressivement un phénotype dysfonctionnel, caractérisé par des altérations pro-oxydantes, pro-inflammatoires, pro-coagulantes, et une perte drastique du NO associée aux maladies cardiovasculaires (Machado-Oliveira et al., 2020), nous avons émis l'hypothèse que la sénescence endothéliale induite par le choc septique serait potentiellement l'un des mécanismes conduisant aux complications cardiovasculaires à long terme. En effet, en plus des données confirmant que le choc septique est associé à une dysfonction vasculaire systémique pendant la phase aiguë, principalement par l'intermédiaire d'une altération de la voie du NO (Boisrame-Helms et al., 2013; Ince et al., 2016), nous rapportons pour la première fois à J90 après un épisode de sepsis, à notre connaissance, la persistance à long terme d'une dysfonction vasculaire avec une dysfonction endothéliale dépendante du temps au niveau des artères de conduction et de résistance et caractérisée par l'altération de la relaxation et de la contraction dépendantes de l'endothélium.

A titre comparatif, il est intéressant de noter que la surexpression sélective de p53 endothéliale dans les anneaux aortiques de rats infectés par un adénovirus vecteur de p53, réduit les relaxations endothélium-dépendantes et la formation de NO (A. Kumar et al., 2011). En ligne avec ces observations, nos données suggèrent fortement que la sénescence induite par p53 joue un rôle central dans l'initiation et le maintien de la dysfonction endothéliale. Nos données constituent un nouvel éclairage sur l'altération à long terme de la production de NO et de la vasoprotection, probablement due à une sénescence accélérée après un choc septique.

Plusieurs études soutiennent nos observations d'un lien entre le sepsis et la sénescence prématuée. Dans un modèle d'endotoxinémie murin, un raccourcissement des télomères a été observé après 48h dans les cellules des reins, de la rate et du sang, indiquant un effet systémique, sans que des dommages endothéliaux soient étudiés (Oliveira et al., 2017). Dans cette étude, l'activité de la télomérase dont le rôle est de protéger les télomères n'était pas diminuée. Cependant, son activité n'était évaluée que durant la première heure suivant l'expérimentation. Même si la SIPS est caractérisée par des cellules qui présentent le plus souvent un profil de sénescence sans diminution de la taille des télomères, ces résultats restent intéressants et nécessiteraient des investigations complémentaires pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Des études in-vitro ont également rapporté une sénescence prématuée après stimulation par du LPS de cellules épithéliales pulmonaires (Kim et al., 2012), d'adipocytes (Zhao & Chen, 2015), de cellules de la microglie (Yu et al., 2012) et de cellules souches de la pulpe dentaire (Feng et al., 2014).

Dans un modèle animal extrêmement pertinent mis au point par l'équipe de Derek Angus à Pittsburgh, des souris prédisposées à l'athérome (ApoE-/-) soumises à une CLP développent après 5 mois des plaques d'athérosclérose le long de l'aorte de manière beaucoup plus importante que les souris du groupe contrôle. Dans ce travail, les auteurs retrouvaient par ailleurs dans le groupe CLP une augmentation des macrophages infiltrant les plaques et des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires IL-6 plus importants à 5 mois. Bien qu'il ne s'agisse pas exactement du même modèle, nos données permettent d'éclairer les mécanismes potentiels de cette athérogenèse accélérée après un sepsis, en mettant en évidence la participation d'une augmentation de la sénescence artérielle et de MMP-9 dans l'endothélium après 3 mois comme nouveaux acteurs. MMP-9 étant une métalloprotéinase matricielle impliquée dans les réponses pro-inflammatoires, la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose (Florence et al., 2017) mais aussi la sénescence au niveau cardiaque en augmentant l'inflammageing (Ma et al., 2015).

Récemment, l'essai CANTOS (*Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study*) a mis en évidence l'intérêt de cibler les réponses pro-inflammatoires pour réduire le risque d'événements cardiovasculaires chez les patients traités par un anticorps monoclonal anti-IL-1 β , alors que la majorité des essais cliniques visant à contrôler les réponses vasculaires médiées par l'inflammation avaient échoué jusque-là (Ridker et al., 2017). De manière intéressante, chez les enfants en état critique hospitalisés en réanimation, l'inflammation était associée au raccourcissement des télomères des leucocytes, ce qui suggère une participation de l'inflammation dans l'accélération de la sénescence (Verstraete et al., 2018). Malgré des données de plus en plus convaincantes dans la littérature, il convient de noter que peu d'études in-vitro et *ex vivo* décrivent un lien causal entre une inflammation prolongée et la sénescence endothéliale. Les cellules sénescentes présentent pourtant un phénotype pro-inflammatoire appelé SASP (Childs et al., 2017), qui peut également contribuer à accélérer l'athérothrombose (Ruparelia & Choudhury, 2020).

Par conséquent, la sénescence endothéliale apparaît comme une cible pharmacologique prometteuse pour limiter la formation de plaques d'athérome et les sénothérapies, en ciblant les cellules sénescentes (Baker et al., 2011; Misuth et al., 2021; Xu et al., 2018), devraient également être considérées comme des thérapies de nouvelle génération pour les patients septiques à fort risque de développer des complications cardiovasculaires (Childs et al., 2016; Dookun et al., 2020). Ainsi, chez des souris hypercholestérolémiques, un traitement chronique par le dasatinib (un pan-inhibiteur de tyrosine kinase) et la quercétine (un antioxydant et anti-inflammatoire de la classe des flavonoïdes présents dans de nombreux fruits et légumes et ciblant principalement la PI3-Kinase et les serpines) a réduit la calcification aortique et la perte consécutive de la fonction cardiovasculaire (Roos et al., 2016). Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez des souris âgées, l'administration d'ABT263, un autre médicament sénolytique, a amélioré le remodelage du myocarde, la fonction diastolique et la survie globale (Walaszczuk et al., 2019).

De nombreuses sénothérapies pourraient ainsi être discutées pour évaluer leur impact sur l'athérosclérose post-septique mais dans un souci de pragmatisme, il conviendrait de choisir pour établir et valider de futurs modèles animaux des molécules déjà testées chez l'homme et ayant fait preuve de leur bonne tolérance. A ce titre, le dasatinib et la quercétine sont associées à une bonne tolérance dans le premier essai clinique chez l'homme (Justice et al., 2019). Et très récemment, Kirkland et ses collègues de la Mayo Clinic ont démontré pour la première fois qu'un traitement de 3 jours, par un cocktail de dasatinib (100 mg/jour) et quercétine (500 mg deux fois par jour), permettait de réduire le nombre de cellules sénescentes chez des patients avec facteurs de risques cardio-vasculaires (âgés de 55 à 79 ans) mais aussi la production du SASP (Hickson et al., 2019). Ainsi, dans cet essai clinique, les marqueurs des cellules sénescentes, p16^{INK4A}, p21 et SA-β-Gal ont été diminués de 35 %, 17 % et 62 % respectivement dans le tissu adipeux sous-cutané abdominal. Enfin, les principaux facteurs sanguins circulants du SASP, à savoir IL-1 α , IL-2, IL-6 et IL-9 ainsi que les métalloprotéinases matricielles (MMP-2, MMP-9 et MMP-12) étaient significativement plus faibles après traitement.

De manière à cibler plus spécifiquement les cellules endothéliales sénescentes et éviter d'endommager les cellules saines de l'organisme, des nanovecteurs théranostiques sont

actuellement en cours de développement avec des résultats particulièrement prometteurs pour cibler de manière très précise des cellules sénescentes à l'intérieur d'un tissu, notamment en situation de sénescence vasculaire (Belcastro et al., 2021).

L'étude chez l'animal septique présente des limites. La sénescence endothéliale n'est probablement pas le seul mécanisme par lequel le sepsis favorise l'athérogenèse et d'autres voies méritent d'être évaluées. Bien que standardisé, le choc septique induit par CLP entraîne probablement des périctonites par des agents pathogènes différents d'un animal à l'autre, ce qui peut entraîner une hétérogénéité des réponses de l'hôte à l'infection.

De manière à optimiser encore notre modèle et « remplacer » le modèle animal selon la « règle des 3 R » élaborée en 1959 par Russell et Burch, l'évaluation de la sénescence vasculaire pourrait être réalisée sur des organoïdes de vaisseaux sanguins humains. Ces organoïdes de synthèse sont des structures tridimensionnelles qui se sont auto-organisées à partir de cellules souches pluripotentes. Ils contiennent des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des péricytes qui se sont auto-assemblés dans des réseaux capillaires enveloppés par une membrane basale. Récemment, il a été montré pour la première fois que transplanté chez des souris, un organoïde humain vasculaire peut former un arbre vasculaire fonctionnel stable avec des artères, des artéries et des veinules (Wimmer et al., 2019). Bien qu'extrêmement complexe à mettre au point, ces systèmes semblent très intéressants pour identifier et modéliser les régulateurs de la vasculopathie dans le choc septique et le rôle que joue la sénescence dans le sepsis.

La troisième phase de notre travail a consisté à établir une étude clinique chez l'Homme de manière à caractériser l'impact du choc septique sur la sénescence endothéliale et lymphocytaire chez les patients de réanimation par comparaison au profil des volontaires sains de la même tranche d'âge n'ayant pas fait de choc septique.

Malgré d'intenses efforts, nous n'avons à ce stade réussi qu'à isoler les cellules endothéliales circulantes chez les patients septiques, mais pas encore à évaluer leur degré de sénescence, probablement du fait d'une fragilité importante des CEC, susceptibles d'être détruites par les manipulations d'isolement et de marquage, ou même rapidement éliminées par le système réticulo-endothélial ce qui expliquerait leurs faibles taux sanguins.

De nombreux facteurs interviennent dans le processus de détachement des CEC, notamment une interaction réduite entre les cellules endothéliales et les protéines de la membrane basale, un état d'endommagement des molécules d'adhésion cellulaire endothéliale, des lésions mécaniques, une diminution de la survie des protéines du cytosquelette endothélial ou une inflammation majeure (Woywodt et al., 2002).

De manière intéressante, nos analyses mettent en évidence une population CD45-/CD133-/CD34+ /CD31+ /CD309+ mais CD146-. Ces cellules ne semblent pas correspondre à des progéniteurs endothéliaux circulants qui sont également CD146- mais CD133+. Bien que cette population soit peu importante, elle est cependant bien plus importante que la population CD45-/CD133-/CD34+ /CD31+ /CD309+ mais CD146+.

Bien que le CD146 soit l'un des marqueurs de référence des CEC, de nombreuses études portant sur ces cellules ne l'utilisent pas. Il s'avère en effet que sa présence reste discutée dans la littérature (Danova et al., 2016; Duda et al., 2006; Kratzer et al., 2013). Le CD146 est une molécule d'adhésion fortement présente à la jonction endothéliale mais en dehors des jonctions serrées et adhérentes. De plus, une surexpression de CD146 est corrélée à une monocouche de vaisseaux plus cohésive (Leroyer et al., 2019). Une des hypothèses concernant les CEC repose donc sur le fait que CD146 ne soit pas exprimé par les CEC détachées de l'endothélium ce qui expliquerait la présence de cette population CD45-/CD133-/CD34+ /CD31+ /CD309+ mais CD146-.

Par ailleurs, en analysant en détail les figures de l'article De Biasi *et al.* qui propose d'optimiser la technique de détection des CEC par cytométrie en flux, les cellules étudiées sont CD146- contrairement à ce qui est indiqué dans le corps du texte (De Biasi et al., 2018)

Plusieurs limites existent cependant concernant les CEC, quand bien même nous arriverions à évaluer la sénescence sur ces cellules, il n'est pas possible à ce jour de connaître leur origine exacte voire même de savoir s'il s'agit de cellules endothéliales provenant du réseau veineux ou artériel. Dans ce travail, reposant sur les atteintes qui pourraient survenir au niveau de l'endothélium des artères coronaires (pour expliquer les SCA) ou des artères cérébrales (pour expliquer les AVC), il pourrait donc être envisagé de réaliser des prélèvements *in situ* par cathétérisation artérielle. Cependant, la complexité de la mise en œuvre et l'aspect non éthique infirment cette possibilité. De plus, l'analyse comparative décrite dans certains travaux entre les CEC du sang périphérique et des sites artériels spécifiques suggèrent parfois une absence de différence. Ainsi, chez des populations très spécifiques de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire, une pathologie dans laquelle le taux de CEC est augmenté, les auteurs rapportent une absence de différences quantitatives significatives en terme de numération des CEC entre les deux sites de prélèvements (Smadja et al., 2010).

Un autre moyen d'évaluer l'évolution de la sénescence chez nos patients *via* des technologies plus faciles d'accès pourrait reposer sur l'épigénétique. Beaucoup de preuves récentes suggèrent que de nombreuses manifestations de la sénescence sont aussi épigénétiques (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Yang & Sen, 2018). C'est ainsi que l'une des révolutions scientifiques en biologie des dix dernières années a probablement été la mise au point de tests permettant de définir une « horloge épigénétique ». A noter, cette « horloge biologique » particulière, ainsi que les autres horloges épigénétiques mises au point depuis, ne sont pas à confondre avec l'horloge biologique circadienne (Allada & Bass, 2021) relevant plus communément de la chronobiologie.

L'horloge épigénétique d'Horvath, la première horloge épigénétique utilisable sur de nombreux types cellulaires, a été mise au point en 2013 par Steve Horvath de l'université de Californie à Los Angeles (UCLA), à partir de données provenant de milliers d'échantillons de tissus. En se basant sur le profil de méthylation (hypo- ou hyperméthylation) de 353 sites CpG du génome, le chercheur a mis au point un algorithme permettant de déterminer l'âge biologique des cellules (Horvath, 2013).

En effet, la sénescence est associée à des changements de méthylation de l'ADN sur des sites spécifiques du génome, le niveau global de méthylation de l'ADN ayant tendance à diminuer avec l'âge. La méthylation de l'ADN est une modification chimique réversible qui concerne principalement les cytosines lorsque celles-ci sont suivies par des guanines. Ces sites de méthylation de l'ADN composés de ces deux nucléotides sont appelés « CpGs » et leur répartition au sein du génome, loin d'être aléatoire, se situe dans des îlots CpG situés le plus souvent à l'extrémité 5' d'une région promotrice des gènes. L'une des principales fonctions de la méthylation est en effet de réguler l'expression du génome *via* une modification de l'architecture de la chromatine qui conditionne l'accès des facteurs de transcription et des régulateurs polymérase, empêchant finalement leur fixation et activité. Ainsi, une faible méthylation (hypométhylation) se traduit le plus souvent par une forte expression du gène alors qu'un haut niveau de méthylation (hyperméthylation) aura tendance à inactiver le gène. Ainsi, certains sites se méthylent de plus en plus avec les années, d'autres se déméthylent de plus en plus. Les modifications épigénétiques étant transmises au cours des divisions cellulaires, c'est donc à partir de certains de ces profils de méthylation qu'il est désormais possible de prédire l'âge biologique d'un individu (Benayoun et al., 2015). De plus, une horloge épigénétique objectivant un âge biologique plus important que l'âge chronologique d'un individu est associée à un risque accru de développer des maladies liées à l'âge et de décès (Horvath & Raj, 2018).

L'avantage de ces nouvelles techniques d'évaluation de la sénescence repose sur la rapidité de modulation de l'épigénome, en effet des études récentes rapportent des modifications épigénétiques significatives de ce « méthylome » de l'ADN après des interventions dont la durée est inférieure à 12h (Chaix et al., 2020). De plus, des évaluations fiables peuvent être réalisées à partir de différents tissus, dont certains très faciles d'accès, tels la salive ou le sang (Hannon et al., 2021).

La perturbation épigénétique est aussi associée à la SIPS, où elle peut même contribuer à déclencher et entretenir la sénescence induite lors d'une SIPS (Sidler et al., 2017). Ainsi, certaines molécules toxiques à l'origine de SIPS inhibent les méthyltransférases pour permettre la déméthylation ciblée et ainsi l'activation transcriptionnelle de CDKi, tels p21 ou p16 (Ryu et al., 2019). Au niveau de l'ADN, la SIPS est caractérisée par une hypométhylation

globale de l'ADN qui ne se superpose que partiellement avec celle qui est observée au cours de la sénescence réplicative (Zhang et al., 2008).

La méthylation de l'ADN n'est pas le seul variant épigénétique modifié durant le vieillissement qui pourrait servir de marqueur. Une modification post-traductionnelle touche aussi les histones (méthylation, acétylation, phosphorylation...), ce qui peut affecter l'état de la chromatine et modifier la régulation de l'expression d'un gène à la hausse ou à la baisse. Des modifications spécifiques des histones sont retrouvées plus fréquemment durant le vieillissement sans que ces modifications ne soient incorporées dans le calcul « d'horloges épigénétiques » à ce jour (Horvath & Raj, 2018).

Très récemment, une équipe allemande a mis au point une nouvelle horloge biologique se basant sur le transcriptome par séquençage de l'ARN, à partir de fibroblastes provenant du derme pour la partie humaine de l'étude. Intitulée "BiT age" pour horloge de vieillissement transcriptomique binarisée, elle permet un niveau de précision supérieur aux autres horloges épigénétiques même si des investigations sur d'autres tissus sont encore nécessaires (Meyer & Schumacher, 2021). Une fois de plus cependant, un facteur limitant pour l'utilisation de ces techniques dans notre étude clinique réside dans la spécificité de l'épigénome. En effet, à moins de réussir à isoler des populations cellulaires spécifiques, il est difficile d'identifier à quel type cellulaire se rattache les modifications épigénétiques. Or il semble que les différents tissus ne vieillissent pas de manière homogène. Ainsi, en analysant des tissus issus de différents sites prélevés simultanément chez les mêmes individus, Horvath a mis en évidence grâce à son horloge épigénétique que le tissu mammaire (sans plus de précision) chez l'ensemble des femmes vieillissait plus rapidement que les autres tissus. De même, les tissus issus de cancer peuvent avoir jusqu'à plus de 30 ans de différence d'âge par rapport au reste de l'organisme en se basant sur cette même horloge. A l'inverse, chez un groupe de patients, l'âge épigénétique du tissu cardiaque (sans plus de précision) était plus jeune que l'âge épigénétique d'autres parties du corps.

Concernant l'étude de la sénescence lymphocytaire, bien que le recrutement des patients dans l'étude SeneShock soit déjà en cours, le nombre de patients n'est pas encore suffisant pour pouvoir analyser les résultats et les comparer au groupe de volontaires sains. Pour cette

partie de l'étude nous avons fait le choix de ne pas utiliser l'activité de la SA- β -Gal pour évaluer la sénescence bien que cela soit validé dans la littérature (Martinez-Zamudio et al., 2021). En effet, cette évaluation bien qu'extrêmement fiable nécessite la réalisation de manipulations complémentaires longues à réaliser après les prélèvements. Nous nous sommes donc basés sur des panels validés et reconnus dans la littérature permettant d'évaluer le degré de sénescence des lymphocytes, plus facilement et rapidement réalisables grâce aux techniques de cytométrie en flux (Zhang et al., 2021). Cette évaluation n'est malheureusement pas possible pour les CEC, puisqu'il n'existe pas à ce jour d'autre méthode d'évaluation de la sénescence qui soit aussi bien validée que l'activité de la SA- β -Gal.

En cas de résultats objectivant l'accélération de l'immunosénescence lors du choc septique comme nous en avons émis l'hypothèse, des traitements pourraient être envisagés. En effet, des études récentes semblent montrer que des traitements pourraient induire un ralentissement de l'immunosénescence voire même une inversion de ce phénomène. Dans une étude intitulée TRIIM (*Thymus Regeneration, Immunorestoration, and Insulin Mitigation*) menée par Horvath, des hommes, âgés de 51 à 65 ans, en bonne santé ont pris, durant une année de l'hormone de croissance de synthèse (hrGH) dans le but de stimuler le thymus et d'évaluer l'impact sur l'immunosénescence (Fahy et al., 2019). Ce traitement entraînant fréquemment des hyperglycémies, les participants étaient traités en plus par metformine et DHEA (bien que l'indication de la DHEA ne soit pas validée pour cette indication). Les résultats ont mis en évidence une régénération du thymus et une diminution des marqueurs habituellement retrouvés dans l'immunosénescence avec notamment une augmentation du ratio lymphocyte-monocyte, une diminution des lymphocytes T CD8+ PD-1+ et une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs. De plus le traitement permettait non pas de ralentir « l'horloge épigénétique » mais de l'inverser, avec un rajeunissement moyen estimé à 1,5 an. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés, ils montrent pour la première fois une régénération possible du thymus de manière concomitante à une diminution de l'âge épigénétique. D'autres pistes thérapeutiques sont aussi en cours de développement pour lutter contre l'immunosénescence voire l'inverser (Aiello et al., 2019).

Conclusion et perspectives

Le choc septique est le stade de gravité extrême du sepsis se caractérisant par une atteinte systémique de l'organisme responsable d'une défaillance multi-viscérale. La réponse hyper-inflammatoire initiale fait intervenir de nombreux médiateurs et cytokines pro-inflammatoires qui exercent une action sur les cellules immunitaires, mais également sur les cellules endothéliales. Responsable d'une morbi-mortalité importante, le choc septique a été surtout étudié à la phase aiguë, notamment concernant la physiopathologie de la réponse immunitaire et endothéliale.

Cependant, des données observationnelles récentes mettent en évidence des séquelles sérieuses chez les survivants à un choc septique avec des effets négatifs persistants au long cours, regroupés sous le terme « syndrome post-sepsis ». Parmi les conséquences à long terme émaillant le syndrome post-sepsis, l'augmentation du risque de développer des complications cardiovasculaires inexpliquées et/ou l'avènement d'un épisode infectieux surajoutés (potentiellement nosocomial) représentent des préoccupations émergentes. Ces complications expliquent en grande partie la morbi-mortalité inquiétante chez les survivants à un choc septique.

Le syndrome post-sepsis est notamment marqué par une dysfonction immunitaire persistante, expliquant en partie les risques de récidives d'infections et de développement de complications cardio-vasculaires telles un SCA, un AVC ou une insuffisance cardiaque aiguë. Récemment, la sénescence, définie comme l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, a été identifiée comme un mécanisme de dysfonction cellulaire qui perdure dans le temps. Habituellement liée à l'âge lorsqu'il s'agit de sénescence réplicative, elle peut aussi être « induite » de manière « prématuée » par un stress majeur. Ainsi, une sénescence prématuée induite par le choc septique au niveau du système immunitaire et cardio-vasculaire pourrait en partie contribuer à la physiopathologie et aux conséquences à long terme du syndrome post-sepsis.

Dans ce contexte, et partant de ce constat, l'objectif de ce travail de thèse a été d'appréhender les relations potentielles entre le sepsis et la sénescence prématuée induite (ou sénescence accélérée). En particulier, les mécanismes cellulaires clés contribuant aux infections récurrentes et aux événements cardiovasculaires chez des patients convalescents déjà lourdement affectés par un sepsis.

Les résultats de ce travail de thèse, bien qu'encore préliminaires, mettent en évidence l'existence d'une sénescence prématuée de l'endothélium et du tissu vasculaire induite par un sepsis. Ce phénomène pourrait être impliqué dans l'athérogenèse accélérée chez les survivants du sepsis, dans un modèle animal. Le ciblage des cellules endothéliales prosénescentes par des sénothérapies dans le syndrome post-sepsis pourrait sembler prometteur pour retarder la sénescence endothéliale et améliorer la santé vasculaire et éviter ou atténuer le syndrome post-sepsis.

Références

(WHO), W. h. o. (2018). *Ageing and health*. Retrieved July, 2021 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>

Abbas, M., Jesel, L., Auger, C., Amoura, L., Messas, N., Manin, G., Rumig, C., Leon-Gonzalez, A. J., Ribeiro, T. P., Silva, G. C., Abou-Merhi, R., Hamade, E., Hecker, M., Georg, Y., Chakfe, N., Ohlmann, P., Schini-Kerth, V. B., Toti, F., & Morel, O. (2017, Jan 17). Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways. *Circulation*, 135(3), 280-296. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.017513>

Adewoye, A. B., Tampakis, D., Follenzi, A., & Stolzing, A. (2020, Dec). Multiparameter flow cytometric detection and quantification of senescent cells in vitro. *Biogerontology*, 21(6), 773-786. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09893-9>

Agrawal, A., Sridharan, A., Prakash, S., & Agrawal, H. (2012, Jan). Dendritic cells and aging: consequences for autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol*, 8(1), 73-80. <https://doi.org/10.1586/eci.11.77>

Aiello, A., Farzaneh, F., Candore, G., Caruso, C., Davinelli, S., Gambino, C. M., Ligotti, M. E., Zareian, N., & Accardi, G. (2019). Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*, 10, 2247. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247>

Aird, K. M., & Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol*, 965, 185-196. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12

Aird, W. C. (2003, May 15). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 101(10), 3765-3777. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1887>

Aird, W. C. (2007, Feb 2). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 100(2), 158-173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>

Akbar, A. N., & Henson, S. M. (2011, Apr). Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol*, 11(4), 289-295. <https://doi.org/10.1038/nri2959>

Allada, R., & Bass, J. (2021, Feb 11). Circadian Mechanisms in Medicine. *N Engl J Med*, 384(6), 550-561. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1802337>

Allingham, M. J., van Buul, J. D., & Burridge, K. (2007, Sep 15). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol*, 179(6), 4053-4064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4053>

Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol*, 9, 2379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>

Amirifar, P., Ranjouri, M. R., Lavin, M., Abolhassani, H., Yazdani, R., & Aghamohammadi, A. (2020, Sep). Ataxia-telangiectasia: epidemiology, pathogenesis, clinical phenotype, diagnosis, prognosis and management. *Expert Rev Clin Immunol*, 16(9), 859-871. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1810570>

Annane, D., Bellissant, E., & Cavaillon, J. M. (2005, Jan 1-7). Septic shock. *Lancet*, 365(9453), 63-78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17667-8)

Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. W., Nestel, F. P., Ni, H., Lazarus, A. H., Freedman, J., & Semple, J. W. (2006, Jan 15). Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*, 107(2), 637-641. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2202>

Augustin, H. G., Kozian, D. H., & Johnson, R. C. (1994, Dec). Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, 16(12), 901-906. <https://doi.org/10.1002/bies.950161208>

Ayala, F. J. (2009, Jun 16). Darwin and the scientific method. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 Suppl 1, 10033-10039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901404106>

Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derk, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijken, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van, I. W. F., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Madl, T., Hoeijmakers, J. H. J., Campisi, J., & de Keizer, P. L. J. (2017, Mar 23). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, 169(1), 132-147 e116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>

Back, M., Yurdagul, A., Jr., Tabas, I., Oorni, K., & Kovanen, P. T. (2019, Jul). Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*, 16(7), 389-406. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0169-2>

Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L., & van Deursen, J. M. (2011, Nov 2). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232-236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>

Barbe-Tuana, F., Funchal, G., Schmitz, C. R. R., Maurmann, R. M., & Bauer, M. E. (2020, Oct). The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Semin Immunopathol*, 42(5), 545-557. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00806-z>

Barth, E., Radermacher, P., Thiemermann, C., Weber, S., Georgieff, M., & Albuszies, G. (2006, Feb). Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*, 34(2), 307-313. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000199070.46812.21>

Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020, Jan). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol*, 18(1), e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>

Bauer, M. E. (2020). Accelerated immunosenescence in rheumatoid arthritis: impact on clinical progression. *Immun Ageing*, 17, 6. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00178-w>

Belcastro, E., Rehman, A. U., Remila, L., Park, S. H., Gong, D. S., Anton, N., Auger, C., Lefebvre, O., Goetz, J. G., Collot, M., Klymchenko, A. S., Vandamme, T. F., & Schini-Kerth, V. B. (2021, Jun). Fluorescent nanocarriers targeting VCAM-1 for early detection of senescent endothelial cells. *Nanomedicine*, 34, 102379. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102379>

Benayoun, B. A., Pollina, E. A., & Brunet, A. (2015, Oct). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(10), 593-610. <https://doi.org/10.1038/nrm4048>

Benjamim, C. F., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., & Kunkel, S. L. (2003, Dec). Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol*, 163(6), 2605-2617. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63615-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63615-2)

Benkusky, N. A., Lewis, S. J., & Kooy, N. W. (1999, Jan 8). Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol*, 364(2-3), 151-158. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00791-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00791-2)

Besnier E, D. E., Coquerel D, Tamion F. (2015). Les voies du monoxyde d'azote dans le sepsis. *Réanimation*. <https://doi.org/10.1007/s13546-015-1044-8>

Bielawski, K., Wolczynski, S., & Bielawska, A. (2001, Jun). DNA-binding activity and cytotoxicity of the extended diphenylfuran bisamidines in breast cancer MCF-7 cells. *Biol Pharm Bull*, 24(6), 704-706. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.704>

Boisrame-Helms, J., Kremer, H., Schini-Kerth, V., & Meziani, F. (2013, Mar 1). Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol*, 11(2), 150-160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506494>

Bonaventura, A., Vecchie, A., Dagna, L., Martinod, K., Dixon, D. L., Van Tassell, B. W., Dentali, F., Montecucco, F., Massberg, S., Levi, M., & Abbate, A. (2021, May). Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 21(5), 319-329. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9>

Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992, Jun). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), 1644-1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>

Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., Bricker, T. L., Jarman, S. D., 2nd, Kreisel, D., Krupnick, A. S., Srivastava, A., Swanson, P. E., Green, J. M., & Hotchkiss, R. S. (2011, Dec 21). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*, 306(23), 2594-2605. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1829>

Borodkina, A. V., Deryabin, P. I., Giukova, A. A., & Nikolsky, N. N. (2018, Jan-Mar). "Social Life" of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10(1), 4-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713514>

Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D. C., & Koup, R. A. (2003, Apr 1). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 101(7), 2711-2720. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2103>

Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G., & Douek, D. C. (2006, Dec). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12(12), 1365-1371. <https://doi.org/10.1038/nm1511>

Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Shugay, M., Merzlyak, E. M., Turchaninova, M. A., Staroverov, D. B., Bolotin, D. A., Lukyanov, S., Bogdanova, E. A., Mamedov, I. Z., Lebedev, Y. B., & Chudakov, D. M. (2014, Mar 15). Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*, 192(6), 2689-2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302064>

Bruno, T., De Nicola, F., Iezzi, S., Lecis, D., D'Angelo, C., Di Padova, M., Corbi, N., Dimiziani, L., Zannini, L., Jekimovs, C., Scarsella, M., Porrello, A., Chersi, A., Crescenzi, M., Leonetti, C., Khanna, K. K., Soddu, S., Floridi, A., Passananti, C., Delia, D., & Fanciulli, M. (2006, Dec). Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell*, 10(6), 473-486. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.012>

Burger, D., Kwart, D. G., Montezano, A. C., Read, N. C., Kennedy, C. R., Thompson, C. S., & Touyz, R. M. (2012, Jun). Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *J Am Heart Assoc*, 1(3), e001842. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001842>

Burstein, S. M., & Finch, C. E. (2018, Aug). Longevity examined: an ancient Greek's very modern views on ageing. *Nature*, 560(7719), 430. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05986-1>

Burton, D. G., & Krizhanovsky, V. (2014, Nov). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*, 71(22), 4373-4386. <https://doi.org/10.1007/s0018-014-1691-3>

Butcher, S. K., Chahal, H., Nayak, L., Sinclair, A., Henriquez, N. V., Sapey, E., O'Mahony, D., & Lord, J. M. (2001, Dec). Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol*, 70(6), 881-886. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739550>

Cai, Y., Zhou, H., Zhu, Y., Sun, Q., Ji, Y., Xue, A., Wang, Y., Chen, W., Yu, X., Wang, L., Chen, H., Li, C., Luo, T., & Deng, H. (2020, Jul). Elimination of senescent cells by beta-galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res*, 30(7), 574-589. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0314-9>

Calfee, C. S., & Matthay, M. A. (2010, Mar 4). Clinical immunology: Culprits with evolutionary ties. *Nature*, 464(7285), 41-42. <https://doi.org/10.1038/464041a>

Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007, Sep). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>

Carpenter, V. J., Saleh, T., & Gewirtz, D. A. (2021, Feb 10). Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers (Basel)*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/cancers13040723>

Carr, C., Bild, G. S., Chang, A. C., Peer, G. T., Palmier, M. O., Frazier, R. B., Gustafson, M. E., Wun, T. C., Creasey, A. A., Hinshaw, L. B., & et al. (1994, Nov). Recombinant *E. coli*-derived tissue factor pathway inhibitor reduces coagulopathic and lethal effects in the baboon gram-negative model of septic shock. *Circ Shock*, 44(3), 126-137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600636>

Cavaillon, J. M., Singer, M., & Skrecki, T. (2020, Apr 7). Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med*, 12(4), e10128. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810128>

Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. (2018, Jul 7). Sepsis and septic shock. *Lancet*, 392(10141), 75-87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)

Chaix, R., Fagny, M., Cosin-Tomas, M., Alvarez-Lopez, M., Lemee, L., Regnault, B., Davidson, R. J., Lutz, A., & Kaliman, P. (2020, Feb). Differential DNA methylation in experienced meditators after an intensive day of mindfulness-based practice: Implications for immune-related pathways. *Brain Behav Immun*, 84, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.003>

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016, Jan). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*, 22(1), 78-83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>

Charo, R. A., & Sipp, D. (2018, Feb 8). Rejuvenating Regenerative Medicine Regulation. *N Engl J Med*, 378(6), 504-505. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1715736>

Chen, M. S., Lee, R. T., & Garber, J. C. (2021, May 7). Senescence mechanisms and targets in the heart. *Cardiovasc Res*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab161>

Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014, Nov). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, 15(11), 1139-1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>

Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2016, Oct 28). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, 354(6311), 472-477. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>

Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017, Oct). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, 16(10), 718-735. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>

Childs, B. G., Li, H., & van Deursen, J. M. (2018, Apr 2). Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 128(4), 1217-1228. <https://doi.org/10.1172/JCI95146>

Chinn, I. K., Blackburn, C. C., Manley, N. R., & Sempowski, G. D. (2012, Oct). Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol*, 24(5), 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.005>

Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004, Feb 13). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303(5660), 1010-1014. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>

Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017, Jul). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*, 39(5), 517-528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010, Oct 22). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2), 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>

Clark, P. R., Kim, R. K., Pober, J. S., & Kluger, M. S. (2015). Tumor necrosis factor disrupts claudin-5 endothelial tight junction barriers in two distinct NF- κ B-dependent phases. *PLoS One*, 10(3), e0120075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120075>

Cobrinik, D. (2005, Apr 18). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24(17), 2796-2809. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208619>

Coleman, P. R., Hahn, C. N., Grimshaw, M., Lu, Y., Li, X., Brautigan, P. J., Beck, K., Stocker, R., Vadas, M. A., & Gamble, J. R. (2010, Nov 11). Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood*, 116(19), 4016-4024. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-252700>

Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007, Jul 27). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>

Constantinescu, A. A., Vink, H., & Spaan, J. A. (2003, Sep 1). Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(9), 1541-1547. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000085630.24353.3D>

Corrales-Medina, V. F., Alvarez, K. N., Weissfeld, L. A., Angus, D. C., Chirinos, J. A., Chang, C. C., Newman, A., Loehr, L., Folsom, A. R., Elkind, M. S., Lyles, M. F., Kronmal, R. A., & Yende, S. (2015, Jan 20). Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA*, 313(3), 264-274. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.18229>

Corrales-Medina, V. F., Serpa, J., Rueda, A. M., Giordano, T. P., Bozkurt, B., Madjid, M., Twardy, D., & Musher, D. M. (2009, May). Acute bacterial pneumonia is associated with the occurrence of acute coronary syndromes. *Medicine (Baltimore)*, 88(3), 154-159. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181a692f0>

Costa, E. D., Rezende, B. A., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2016). Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*, 7, 206. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00206>

Covre, L. P., Martins, R. F., Devine, O. P., Chambers, E. S., Vukmanovic-Stejic, M., Silva, J. A., Dietze, R., Rodrigues, R. R., de Matos Guedes, H. L., Falqueto, A., Akbar, A. N., & Gomes, D. C. O. (2018). Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol*, 9, 3001. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03001>

Creasey, A. A., Chang, A. C., Feigen, L., Wun, T. C., Taylor, F. B., Jr., & Hinshaw, L. B. (1993, Jun). Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. *J Clin Invest*, 91(6), 2850-2860. <https://doi.org/10.1172/JCI116529>

Csizsar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J. G., & Kaley, G. (2004, Mar 12). Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol Genomics*, 17(1), 21-30. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00136.2003>

Cuollo, L., Antonangeli, F., Santoni, A., & Soriani, A. (2020, Dec 21). The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology (Basel)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biology9120485>

Danese, S., Vetrano, S., Zhang, L., Poplis, V. A., & Castellino, F. J. (2010, Feb 11). The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood*, 115(6), 1121-1130. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-201616>

Danova, M., Comolli, G., Manzoni, M., Torchio, M., & Mazzini, G. (2016, Jun). Flow cytometric analysis of circulating endothelial cells and endothelial progenitors for clinical purposes in oncology: A critical evaluation. *Mol Clin Oncol*, 4(6), 909-917. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.823>

De Biasi, S., Gibellini, L., Feletti, A., Pavesi, G., Bianchini, E., Lo Tartaro, D., Pecorini, S., De Gaetano, A., Pullano, R., Boraldi, F., Nasi, M., Pinti, M., & Cossarizza, A. (2018, Feb 1). High speed flow cytometry allows the detection of circulating endothelial cells in hemangioblastoma patients. *Methods*, 134-135, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.11.002>

de Jonge, E., Dekkers, P. E., Creasey, A. A., Hack, C. E., Paulson, S. K., Karim, A., Kesecioglu, J., Levi, M., van Deventer, S. J., & van Der Poll, T. (2000, Feb 15). Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood*, 95(4), 1124-1129. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666180>

de Lange, T. (2005, Sep 15). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19(18), 2100-2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>

Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J., & Toussaint, O. (2005, Feb 15). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 118(Pt 4), 743-758. <https://doi.org/10.1242/jcs.01651>

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4(12), 1798-1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>

Deeks, S. G. (2011). HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*, 62, 141-155. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042909-093756>

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M. E., Hoeijmakers, J. H., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014, Dec 22). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>

Desai, S., & Landay, A. (2010, Feb). Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*, 7(1), 4-10. <https://doi.org/10.1007/s11904-009-0038-4>

Dikic, I., & Elazar, Z. (2018, Jun). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 349-364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Dimri, G. P., & Campisi, J. (1994). Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59, 67-73. <https://doi.org/10.1101/sqb.1994.059.01.010>

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., & et al. (1995, Sep 26). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

Dimri, G. P., Testori, A., Acosta, M., & Campisi, J. (1996, May-Jun). Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol Signals*, 5(3), 154-162. <https://doi.org/10.1159/000109185>

Dinarello, C. A. (2007, Nov). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1, S34-45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>

Dolmatova, E. V., Wang, K., Mandavilli, R., & Griendling, K. K. (2021, Jan 1). The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovasc Res*, 117(1), 60-73. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa070>

Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E., & Lesniewski, L. A. (2015, Dec). Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 89(Pt B), 122-135. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.021>

Dookun, E., Passos, J. F., Arthur, H. M., & Richardson, G. D. (2020, Sep 26). Therapeutic Potential of Senolytics in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07075-w>

Duda, D. G., Cohen, K. S., di Tomaso, E., Au, P., Klein, R. J., Scadden, D. T., Willett, C. G., & Jain, R. K. (2006, Mar 20). Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and

progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. *J Clin Oncol*, 24(9), 1449-1453. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.2861>

Duggal, N. A., Pollock, R. D., Lazarus, N. R., Harridge, S., & Lord, J. M. (2018, Apr). Major features of immunesenescence, including reduced thymic output, are ameliorated by high levels of physical activity in adulthood. *Aging Cell*, 17(2). <https://doi.org/10.1111/ace.12750>

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J., & Toussaint, O. (2000, Feb 1). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, 28(3), 361-373. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00249-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00249-x)

Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E. S., & Toussaint, O. (2002, Jan). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, 7(1), 23-35. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2002\)007<0023:ooajih>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0023:ooajih>2.0.co;2)

Dupuis, C., Bouadma, L., Ruckly, S., Perozziello, A., Van-Gysel, D., Mageau, A., Mourvillier, B., de Montmollin, E., Bailly, S., Papin, G., Sinnah, F., Vinclair, C., Abid, S., Sonneville, R., & Timsit, J. F. (2020, Oct 20). Sepsis and septic shock in France: incidences, outcomes and costs of care. *Ann Intensive Care*, 10(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00760-x>

Eelen, G., de Zeeuw, P., Treps, L., Harjes, U., Wong, B. W., & Carmeliet, P. (2018, Jan 1). Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev*, 98(1), 3-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2017>

Elwenspoek, M. M. C., Sias, K., Hengesch, X., Schaan, V. K., Leenen, F. A. D., Adams, P., Meriaux, S. B., Schmitz, S., Bonnemberger, F., Ewen, A., Schachinger, H., Vogele, C., Muller, C. P., & Turner, J. D. (2017). T Cell Immunosenescence after Early Life Adversity: Association with Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol*, 8, 1263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01263>

Engelmann, B., & Massberg, S. (2013, Jan). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 34-45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>

Esme, M., Topeli, A., Yavuz, B. B., & Akova, M. (2019). Infections in the Elderly Critically-III Patients. *Front Med (Lausanne)*, 6, 118. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00118>

Fahy, G. M., Brooke, R. T., Watson, J. P., Good, Z., Vasanawala, S. S., Maecker, H., Leipold, M. D., Lin, D. T. S., Kobor, M. S., & Horvath, S. (2019, Dec). Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell*, 18(6), e13028. <https://doi.org/10.1111/ace.13028>

Faner, R., Rojas, M., Macnee, W., & Agusti, A. (2012, Aug 15). Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 186(4), 306-313. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0282PP>

Faragher, R. G. (2015). Should we treat aging as a disease? The consequences and dangers of miscategorisation. *Front Genet*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00171>

Feehan, J., Tripodi, N., & Apostolopoulos, V. (2021, May). The twilight of the immune system: The impact of immunosenescence in aging. *Maturitas*, 147, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2021.02.006>

Feng, X., Feng, G., Xing, J., Shen, B., Tan, W., Huang, D., Lu, X., Tao, T., Zhang, J., Li, L., & Gu, Z. (2014, May). Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res*, 356(2), 369-380. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1799-7>

Ferro, G., Duilio, C., Spinelli, L., Liucci, G. A., Mazza, F., & Indolfi, C. (1995, Aug 1). Relation between diastolic perfusion time and coronary artery stenosis during stress-induced myocardial ischemia. *Circulation*, 92(3), 342-347. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.3.342>

Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018, Sep). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*, 15(9), 505-522. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>

Filewod, N. C., & Lee, W. L. (2019, Dec 15). Inflammation without Vascular Leakage. Science Fiction No Longer? *Am J Respir Crit Care Med*, 200(12), 1472-1476. <https://doi.org/10.1164/rccm.201905-1011CP>

Fink, M. P., & Warren, H. S. (2014, Oct). Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov*, 13(10), 741-758. <https://doi.org/10.1038/nrd4368>

Fisher, A. B. (2009, Jun). Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal*, 11(6), 1349-1356. <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2378>

Florence, J. M., Krupa, A., Booshehri, L. M., Allen, T. C., & Kurdowska, A. K. (2017). Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1. *PLoS One*, 12(2), e0171427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171427>

Frasca, D. (2018, Jul 1). Senescent B cells in aging and age-related diseases: Their role in the regulation of antibody responses. *Exp Gerontol*, 107, 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.002>

Friedman, G., Silva, E., & Vincent, J. L. (1998, Dec). Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*, 26(12), 2078-2086. <https://doi.org/10.1097/00003246-199812000-00045>

Frimpong, A., Kusi, K. A., Adu-Gyasi, D., Ampontsah, J., Ofori, M. F., & Ndifon, W. (2019). Phenotypic Evidence of T Cell Exhaustion and Senescence During Symptomatic *Plasmodium falciparum* Malaria. *Front Immunol*, 10, 1345. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01345>

Funk, D. J., Parrillo, J. E., & Kumar, A. (2009, Jan). Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin*, 25(1), 83-101, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>

Gager, G. M., Biesinger, B., Hofer, F., Winter, M. P., Hengstenberg, C., Jilma, B., Eyileten, C., Postula, M., Lang, I. M., & Siller-Matula, J. M. (2020, Dec). Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome. *Vascul Pharmacol*, 135, 106806. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2020.106806>

Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004, Jul). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, 93(1), 105-113. <https://doi.org/10.1093/bja/aeh163>

Gaudette, S., Hughes, D., & Boller, M. (2020, Mar). The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 30(2), 117-134. <https://doi.org/10.1111/vec.12925>

Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schomig, A., & Neumann, F. (2000, Jan). Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 148(1), 75-85. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00241-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00241-5)

Geller, D. A., Kispert, P. H., Su, G. L., Wang, S. C., Di Silvio, M., Tweardy, D. J., Billiar, T. R., & Simmons, R. L. (1993, Jan). Induction of hepatocyte lipopolysaccharide binding protein in models of sepsis and the acute-phase response. *Arch Surg*, 128(1), 22-27; discussion 27-28. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1993.01420130026005>

Gendron, N., & Smadja, D. M. (2016, Aug 1). Circulating endothelial cells: a new biomarker of endothelial dysfunction in hematological diseases. *Ann Biol Clin (Paris)*, 74(4), 395-404. <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1160> (Les cellules endothéliales circulantes : nouveau biomarqueur de la dysfonction endothéliale dans les hemopathies.)

Giacomini, E., Perrone, V., Alessandrini, D., Paoli, D., Nappi, C., & Degli Esposti, L. (2021). Evidence of Antibiotic Resistance from Population-Based Studies: A Narrative Review. *Infect Drug Resist*, 14, 849-858. <https://doi.org/10.2147/IDR.S289741>

Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016, Mar 15). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>

Goodwin, A. J., Rice, D. A., Simpson, K. N., & Ford, D. W. (2015, Apr). Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*, 43(4), 738-746. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000859>

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., & Demaria, M. (2019, Oct 31). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

Gouverneur, M., Berg, B., Nieuwdorp, M., Stroes, E., & Vink, H. (2006, Apr). Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med*, 259(4), 393-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01625.x>

Grootaert, M. O., da Costa Martins, P. A., Bitsch, N., Pintelon, I., De Meyer, G. R., Martinet, W., & Schrijvers, D. M. (2015, Nov 2). Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy*, 11(11), 2014-2032. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1096485>

Guajardo, L., Aguilar, R., Bustos, F. J., Nardocci, G., Gutierrez, R. A., van Zundert, B., & Montecino, M. (2020, Nov 11). Downregulation of the Polycomb-Associated Methyltransferase Ezh2 during Maturation of Hippocampal Neurons Is Mediated by MicroRNAs Let-7 and miR-124. *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228472>

Hannon, E., Mansell, G., Walker, E., Nabais, M. F., Burrage, J., Kepa, A., Best-Lane, J., Rose, A., Heck, S., Moffitt, T. E., Caspi, A., Arseneault, L., & Mill, J. (2021, Mar). Assessing the co-variability of DNA methylation across peripheral cells and tissues: Implications for the interpretation of findings in epigenetic epidemiology. *PLoS Genet*, 17(3), e1009443. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009443>

Hao, Y., O'Neill, P., Naradikian, M. S., Scholz, J. L., & Cancro, M. P. (2011, Aug 4). A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood*, 118(5), 1294-1304. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330530>

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961, Dec). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

Hazeldine, J., & Lord, J. M. (2013, Sep). The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*, 12(4), 1069-1078. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.04.003>

He, Y., Yuan, X., Zuo, H., Sun, Y., & Feng, A. (2018). Berberine Exerts a Protective Effect on Gut-Vascular Barrier via the Modulation of the Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway During Sepsis. *Cell Physiol Biochem*, 49(4), 1342-1351. <https://doi.org/10.1159/000493412>

Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., & Krocze, R. A. (1998, Feb 5). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391(6667), 591-594. <https://doi.org/10.1038/35393>

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., & Sedivy, J. M. (2006, Mar 3). Cellular senescence in aging primates. *Science*, 311(5765), 1257. <https://doi.org/10.1126/science.1122446>

Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., & Passos, J. F. (2012, Feb 28). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun*, 3, 708. <https://doi.org/10.1038/ncomms1708>

Hickson, L. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., Herrmann, S. M., Jensen, M. D., Jia, Q., Jordan, K. L., Kellogg, T. A., Khosla, S., Koerber, D. M., Lagnado, A. B., Lawson, D. K., LeBrasseur, N. K., Lerman, L. O., McDonald, K. M., McKenzie, T. J., Passos, J. F., Pignolo, R. J., Pirtskhalava, T., Saadiq, I. M., Schaefer, K. K., Textor, S. C., Victorelli, S. G., Volkman, T. L., Xue, A., Wentworth, M. A., Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonia, T., & Kirkland, J. L. (2019, Sep). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*, 47, 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.069>

Higdon, L. E., Gustafson, C. E., Ji, X., Sahoo, M. K., Pinsky, B. A., Margulies, K. B., Maecker, H. T., Goronzy, J., & Maltzman, J. S. (2021). Association of Premature Immune Aging and Cytomegalovirus After Solid Organ Transplant. *Front Immunol*, 12, 661551. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.661551>

Hollenberg, S. M., & Singer, M. (2021, Jun). Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*, 18(6), 424-434. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00492-2>

Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14(10), R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>

Horvath, S., & Raj, K. (2018, Jun). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*, 19(6), 371-384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>

Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016, Jun 30). Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>

Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013, Dec). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13(12), 862-874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>

Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., & Karl, I. E. (2002, May). Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl), S225-228. <https://doi.org/10.1097/00003246-200205001-00009>

Hou, P. C., Filbin, M. R., Wang, H., Ngo, L., Huang, D. T., Aird, W. C., Yealy, D. M., Angus, D. C., Kellum, J. A., Shapiro, N. I., & Pro, C. I. (2017, Jul). Endothelial Permeability and Hemostasis in Septic Shock: Results From the ProCESS Trial. *Chest*, 152(1), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.01.010>

Huet, O., Dupic, L., Harrois, A., & Duranteau, J. (2011, Jan 1). Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1986-1995. <https://doi.org/10.2741/3835>

Iba, T., & Levy, J. H. (2019, Feb). Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *J Thromb Haemost*, 17(2), 283-294. <https://doi.org/10.1111/jth.14371>

Iba, T., Levy, J. H., Raj, A., & Warkentin, T. E. (2019, May 22). Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *J Clin Med*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jcm8050728>

Ince, C., Mayeux, P. R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J. A., Ospina-Tascon, G. A., Hernandez, G., Murray, P., De Backer, D., & Workgroup, A. X. (2016, Mar). The Endothelium in Sepsis. *Shock*, 45(3), 259-270. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473>

Inuzuka, Y., Okuda, J., Kawashima, T., Kato, T., Niizuma, S., Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Yoshida, Y., Kosugi, R., Watanabe-Maeda, K., Machida, Y., Tsuji, S., Aburatani, H., Izumi, T., Kita, T., & Shioi, T. (2009, Oct 27). Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice. *Circulation*, 120(17), 1695-1703. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871137>

Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*, 371, 21-31. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_3

Iwashyna, T. J., Cooke, C. R., Wunsch, H., & Kahn, J. M. (2012, Jun). Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc*, 60(6), 1070-1077. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.03989.x>

Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M., & Langa, K. M. (2010, Oct 27). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*, 304(16), 1787-1794. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>

Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis-Pathophysiology and Therapeutic Concepts. *Front Med (Lausanne)*, 8, 628302. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.628302>

Jin, B., Wang, Y., Wu, C. L., Liu, K. Y., Chen, H., & Mao, Z. B. (2014, Oct). PIM-1 modulates cellular senescence and links IL-6 signaling to heterochromatin formation. *Aging Cell*, 13(5), 879-889. <https://doi.org/10.1111/acel.12249>

Joffre, J., Hellman, J., Ince, C., & Ait-Oufella, H. (2020, Aug 1). Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 202(3), 361-370. <https://doi.org/10.1164/rccm.201910-1911TR>

Justice, J. N., Nambiar, A. M., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Pascual, R., Hashmi, S. K., Prata, L., Masternak, M. M., Kritchevsky, S. B., Musi, N., & Kirkland, J. L. (2019, Feb). Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 40, 554-563. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.052>

Kadri, S. S., Rhee, C., Strich, J. R., Morales, M. K., Hohmann, S., Menchaca, J., Suffredini, A. F., Danner, R. L., & Klompas, M. (2017, Feb). Estimating Ten-Year Trends in Septic Shock Incidence and Mortality in United States Academic Medical Centers Using Clinical Data. *Chest*, 151(2), 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.010>

Karlsson, S., Varpula, M., Ruokonen, E., Pettila, V., Parviainen, I., Ala-Kokko, T. I., Kolho, E., & Rintala, E. M. (2007, Mar). Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med*, 33(3), 435-443. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0504-z>

Karnewar, S., Neeli, P. K., Panuganti, D., Kotagiri, S., Mallappa, S., Jain, N., Jerald, M. K., & Kotamraju, S. (2018, Apr). Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: Relevance in age-associated vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(4 Pt A), 1115-1128. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2018.01.018>

Katsuumi, G., Shimizu, I., Yoshida, Y., & Minamino, T. (2018). Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med*, 5, 18. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00018>

Kaukonen, K. M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D. J., & Bellomo, R. (2015, Apr 23). Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*, 372(17), 1629-1638. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1415236>

Kaynar, A. M., Yende, S., Zhu, L., Frederick, D. R., Chambers, R., Burton, C. L., Carter, M., Stolz, D. B., Agostini, B., Gregory, A. D., Nagarajan, S., Shapiro, S. D., & Angus, D. C. (2014, Sep 3). Effects of intra-abdominal sepsis on atherosclerosis in mice. *Crit Care*, 18(5), 469. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0469-1>

Kelley, W. J., Zemans, R. L., & Goldstein, D. R. (2020, Dec). Cellular senescence: friend or foe to respiratory viral infections? *Eur Respir J*, 56(6). <https://doi.org/10.1183/13993003.02708-2020>

Kerr, H., & Richards, A. (2012, Feb). Complement-mediated injury and protection of endothelium: lessons from atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology*, 217(2), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.028>

Khakpour, S., Wilhelmsen, K., & Hellman, J. (2015, Nov). Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun*, 21(8), 827-846. <https://doi.org/10.1177/1753425915606525>

Khan, S. Y., Awad, E. M., Oswald, A., Mayr, M., Yin, X., Waltenberger, B., Stuppner, H., Lipovac, M., Uhrin, P., & Breuss, J. M. (2017, Jan 3). Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNFalpha can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. *Sci Rep*, 7, 39501. <https://doi.org/10.1038/srep39501>

Khemaïs-Benkhiat, S., Idris-Khodja, N., Ribeiro, T. P., Silva, G. C., Abbas, M., Kheloufi, M., Lee, J. O., Toti, F., Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2016, Dec). The Redox-sensitive Induction of the Local Angiotensin System Promotes Both Premature and Replicative Endothelial Senescence: Preventive Effect of a Standardized Crataegus Extract. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 71(12), 1581-1590. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv213>

Kim, C. O., Huh, A. J., Han, S. H., & Kim, J. M. (2012, Mar-Apr). Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells. *Arch Gerontol Geriatr*, 54(2), e35-41. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2011.07.016>

Kim, M., Allen, B., Korhonen, E. A., Nitschke, M., Yang, H. W., Baluk, P., Saharinen, P., Alitalo, K., Daly, C., Thurston, G., & McDonald, D. M. (2016, Sep 1). Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation. *J Clin Invest*, 126(9), 3511-3525. <https://doi.org/10.1172/JCI84871>

Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006, Oct 20). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003>

Kip, K. E., Hollabaugh, K., Marroquin, O. C., & Williams, D. O. (2008, Feb 19). The problem with composite end points in cardiovascular studies: the story of major adverse cardiac events and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*, 51(7), 701-707. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.034>

Kogut, I., Scholz, J. L., Cancro, M. P., & Cambier, J. C. (2012, Oct). B cell maintenance and function in aging. *Semin Immunol*, 24(5), 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.004>

Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013, Mar). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 159-175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>

Korotchkina, L. G., Leontieva, O. V., Bukreeva, E. I., Demidenko, Z. N., Gudkov, A. V., & Blagosklonny, M. V. (2010, Jun). The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*, 2(6), 344-352. <https://doi.org/10.1863/aging.100160>

Kosyakovsky, L. B., Angriman, F., Katz, E., Adhikari, N. K., Godoy, L. C., Marshall, J. C., Ferreyro, B. L., Lee, D. S., Rosenson, R. S., Sattar, N., Verma, S., Toma, A., Englesakis, M., Burstein, B., Farkouh, M. E., Herridge, M., Ko, D. T., Scales, D. C., Detsky, M. E., Bibas, L., & Lawler, P. R. (2021, Aug 9). Association between sepsis survivorship and long-term cardiovascular outcomes in adults: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06479-y>

Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., & Xiong, Y. (2011, Apr 21). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*, 30(16), 1956-1962. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.568>

Kratzer, A., Chu, H. W., Salys, J., Moumen, Z., Leberl, M., Bowler, R., Cool, C., Zamora, M., & Taraseviciene-Stewart, L. (2013, Aug). Endothelial cell adhesion molecule CD146: implications for its role in the pathogenesis of COPD. *J Pathol*, 230(4), 388-398. <https://doi.org/10.1002/path.4197>

Kremer, H., Baron-Menguy, C., Tesse, A., Gallois, Y., Mercat, A., Henrion, D., Andriantsitohaina, R., Asfar, P., & Meziani, F. (2011, Jun). Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties. *Crit Care Med*, 39(6), 1414-1422. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318211ff6e>

Kuilmann, T., & Peepoer, D. S. (2009, Feb). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*, 9(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>

Kumar, A., Kim, C. S., Hoffman, T. A., Naqvi, A., Dericco, J., Jung, S. B., Lin, Z., Jain, M. K., & Irani, K. (2011, Jan). p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(1), 133-141. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.215061>

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011, Feb). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>

Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*, 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000, Oct). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-3622. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877>

Kwong, J. C., Schwartz, K. L., Campitelli, M. A., Chung, H., Crowcroft, N. S., Karnauchow, T., Katz, K., Ko, D. T., McGeer, A. J., McNally, D., Richardson, D. C., Rosella, L. C., Simor, A.,

Smieja, M., Zahariadis, G., & Gubbay, J. B. (2018, Jan 25). Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection. *N Engl J Med*, 378(4), 345-353. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702090>

Kyriazopoulou, E., Poulakou, G., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2021, Apr 1). Biomarkers in sepsis: can they help improve patient outcome? *Curr Opin Infect Dis*, 34(2), 126-134. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000707>

LaPak, K. M., & Burd, C. E. (2014, Feb). The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. *Mol Cancer Res*, 12(2), 167-183. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0350>

LaRocca, T. J., Henson, G. D., Thorburn, A., Sindler, A. L., Pierce, G. L., & Seals, D. R. (2012, Jul 15). Translational evidence that impaired autophagy contributes to arterial ageing. *J Physiol*, 590(14), 3305-3316. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.229690>

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006, Apr). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187-195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>

Leligdowicz, A., Richard-Greenblatt, M., Wright, J., Crowley, V. M., & Kain, K. C. (2018). Endothelial Activation: The Ang/Tie Axis in Sepsis. *Front Immunol*, 9, 838. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00838>

Leroyer, A. S., Blin, M. G., Bachelier, R., Bardin, N., Blot-Chabaud, M., & Dignat-George, F. (2019, Jun). CD146 (Cluster of Differentiation 146). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(6), 1026-1033. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312653>

Levi, M., & van der Poll, T. (2010, Feb). Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*, 38(2 Suppl), S26-34. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c98d21>

Levi, M., & van der Poll, T. (2013a, Feb). Disseminated intravascular coagulation: a review for the internist. *Intern Emerg Med*, 8(1), 23-32. <https://doi.org/10.1007/s11739-012-0859-9>

Levi, M., & van der Poll, T. (2013b, Oct). Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Med*, 39(10), 1839-1842. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-3054-1>

Levy, B., Fritz, C., Tahon, E., Jacquot, A., Auchet, T., & Kimmoun, A. (2018, Feb 27). Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. *Crit Care*, 22(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1967-3>

Lewis, S. J., Hoque, A., Sandock, K., Robertson, T. P., Bates, J. N., & Kooy, N. W. (2007, Jan). Differential effects of peroxynitrite on the function of arginine vasopressin V(1a) receptors and alpha(1)-adrenoceptors in vivo. *Vascul Pharmacol*, 46(1), 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.06.004>

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007, Sep). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>

Li, H., Luo, Y. F., Wang, Y. S., Xiao, Y. L., Cai, H. R., & Xie, C. M. (2018, Dec 1). *Pseudomonas aeruginosa* induces cellular senescence in lung tissue at the early stage of two-hit septic mice. *Pathog Dis*, 76(9). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftz001>

Li, H., Zhou, X., Huang, Y., Liao, B., Cheng, L., & Ren, B. (2020). Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects. *Front Microbiol*, 11, 622534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622534>

Li, J., Li, S. H., Dong, J., Alibhai, F. J., Zhang, C., Shao, Z. B., Song, H. F., He, S., Yin, W. J., Wu, J., Weisel, R. D., Liu, S. M., & Li, R. K. (2019, Dec). Long-term repopulation of aged bone marrow stem cells using young Sca-1 cells promotes aged heart rejuvenation. *Aging Cell*, 18(6), e13026. <https://doi.org/10.1111/acel.13026>

Liang, Y., Li, X., Zhang, X., Li, Z., Wang, L., Sun, Y., Liu, Z., & Ma, X. (2014, Apr). Elevated levels of plasma TNF-alpha are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock*, 41(4), 275-281. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000116>

Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubenfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., Gibran, N. S., Huang, M. L., Santo Hayes, T. K., Corey, L., & Boeckh, M. (2008, Jul 23). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA*, 300(4), 413-422. <https://doi.org/10.1001/jama.300.4.413>

Lin, J. R., Shen, W. L., Yan, C., & Gao, P. J. (2015, Jun). Downregulation of dynamin-related protein 1 contributes to impaired autophagic flux and angiogenic function in senescent endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(6), 1413-1422. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305706>

Lloyd, K. L., & Kubes, P. (2006, Jul). GPI-linked endothelial CD14 contributes to the detection of LPS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(1), H473-481. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01234.2005>

Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012, Jan 18). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287-294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>

Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., & Schwartz, D. A. (2002, May 13). Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162(9), 1028-1032. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.9.1028>

Luyt, C. E., Combes, A., Deback, C., Aubriot-Lorton, M. H., Nieszkowska, A., Trouillet, J. L., Capron, F., Agut, H., Gibert, C., & Chastre, J. (2007, May 1). Herpes simplex virus lung

infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(9), 935-942. <https://doi.org/10.1164/rccm.200609-1322OC>

Ma, S., Wang, C., Mao, X., & Hao, Y. (2019). B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 10, 318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00318>

Ma, Y., Chiao, Y. A., Clark, R., Flynn, E. R., Yabluchanskiy, A., Ghasemi, O., Zouein, F., Lindsey, M. L., & Jin, Y. F. (2015, Jun 1). Deriving a cardiac ageing signature to reveal MMP-9-dependent inflammatory signalling in senescence. *Cardiovasc Res*, 106(3), 421-431. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv128>

Machado-Oliveira, G., Ramos, C., Marques, A. R. A., & Vieira, O. V. (2020, Sep 23). Cell Senescence, Multiple Organelle Dysfunction and Atherosclerosis. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/cells9102146>

Mankowski, R. T., Yende, S., & Angus, D. C. (2019, Jan). Long-term impact of sepsis on cardiovascular health. *Intensive Care Med*, 45(1), 78-81. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5173-1>

Marshall, J. C. (2014, Apr). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, 20(4), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.007>

Martin, G. S., Mannino, D. M., & Moss, M. (2006, Jan). The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*, 34(1), 15-21. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000194535.82812.ba>

Martinez, I., Garcia-Carpizo, V., Guijarro, T., Garcia-Gomez, A., Navarro, D., Aranda, A., & Zambrano, A. (2016, May 18). Induction of DNA double-strand breaks and cellular senescence by human respiratory syncytial virus. *Virulence*, 7(4), 427-442. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1144001>

Martinez-Zamudio, R. I., Dewald, H. K., Vasilopoulos, T., Gittens-Williams, L., Fitzgerald-Bocarsly, P., & Herbig, U. (2021, May). Senescence-associated beta-galactosidase reveals the abundance of senescent CD8+ T cells in aging humans. *Aging Cell*, 20(5), e13344. <https://doi.org/10.1111/ace.13344>

Mathiasen, S. L., Gall-Mas, L., Pateras, I. S., Theodorou, S. D. P., Namin, M. R. J., Hansen, M. B., Martin, O. C. B., Vadivel, C. K., Ntostoglou, K., Butter, D., Givskov, M., Geisler, C., Akbar, A. N., Gorgoulis, V. G., Frisan, T., Odum, N., & Krejsgaard, T. (2021, Jun 8). Bacterial genotoxins induce T cell senescence. *Cell Rep*, 35(10), 109220. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109220>

Mauriello, A., Sangiorgi, G., Fratoni, S., Palmieri, G., Bonanno, E., Anemona, L., Schwartz, R. S., & Spagnoli, L. G. (2005, May 17). Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a histopathologic study of

patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 45(10), 1585-1593. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.01.054>

Meakins, J. L., Pietsch, J. B., Bubenick, O., Kelly, R., Rode, H., Gordon, J., & MacLean, L. D. (1977, Sep). Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg*, 186(3), 241-250. <https://doi.org/10.1097/00000658-197709000-00002>

Mehta, D., & Malik, A. B. (2006, Jan). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86(1), 279-367. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2005>

Melk, A., Schmidt, B. M., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., & Halloran, P. F. (2004, Feb). Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int*, 65(2), 510-520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x>

Mestas, J., & Ley, K. (2008, Aug). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 18(6), 228-232. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.004>

Meyer, D. H., & Schumacher, B. (2021, Mar). BiT age: A transcriptome-based aging clock near the theoretical limit of accuracy. *Aging Cell*, 20(3), e13320. <https://doi.org/10.1111/ace.13320>

Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P., & Toti, F. (2010). Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care*, 14(5), 236. <https://doi.org/10.1186/cc9231>

Misuth, S., Uhrinova, M., Klimas, J., Vavrinova-Yaghi, D., & Vavrinec, P. (2021, Jun). Vildagliptin improves vascular smooth muscle relaxation and decreases cellular senescence in the aorta of doxorubicin-treated rats. *Vascul Pharmacol*, 138, 106855. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106855>

Mitteldorf, J. (2019, Dec). What Is Antagonistic Pleiotropy? *Biochemistry (Mosc)*, 84(12), 1458-1468. <https://doi.org/10.1134/S0006297919120058>

Mizushima, N. (2018, May). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*, 20(5), 521-527. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0092-5>

Moake, J. L. (2002, Aug 22). Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 347(8), 589-600. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020528>

Mogensen, T. H. (2009, Apr). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 240-273, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>

Monneret, G., Gossez, M., & Venet, F. (2019, Sep 14). Sepsis and immunosenescence: closely associated in a vicious circle. *Aging Clin Exp Res*. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01350-z>

Monroe, D. M., & Key, N. S. (2007, Jun). The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost*, 5(6), 1097-1105. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02435.x>

Morgan, R. G., Ives, S. J., Lesniewski, L. A., Cawthon, R. M., Andtbacka, R. H., Noyes, R. D., Richardson, R. S., & Donato, A. J. (2013, Jul 15). Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(2), H251-258. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00197.2013>

Muller, W. A., & Randolph, G. J. (1999, Nov). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol*, 66(5), 698-704. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.698>

Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013, Nov 21). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>

Munoz-Espin, D., & Serrano, M. (2014, Jul). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>

Musher, D. M., Abers, M. S., & Corrales-Medina, V. F. (2019, Jan 10). Acute Infection and Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 380(2), 171-176. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808137>

Nardi, G. M., Scheschowitsch, K., Ammar, D., de Oliveira, S. K., Arruda, T. B., & Assreuy, J. (2014, Jun). Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Crit Care Med*, 42(6), e391-400. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000301>

National Institutes of Health (NIH) and National Center for Health Statistics (NCHS). (2021). *Estimates of Funding for Various Research, Condition, and Disease Categories (RCDC)*. <https://report.nih.gov/funding/categorical-spending#/>

Naylor, K., Li, G., Vallejo, A. N., Lee, W. W., Koetz, K., Bryl, E., Witkowski, J., Fulbright, J., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2005, Jun 1). The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol*, 174(11), 7446-7452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7446>

Nedeva, C., Menassa, J., & Puthalakath, H. (2019). Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol*, 7, 108. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00108>

Ni, J., Lin, M., Jin, Y., Li, J., Guo, Y., Zhou, J., Hong, G., Zhao, G., & Lu, Z. (2019). Gas6 Attenuates Sepsis-Induced Tight Junction Injury and Vascular Endothelial Hyperpermeability via the Axl/NF-kappaB Signaling Pathway. *Front Pharmacol*, 10, 662. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00662>

Nolan, D. J., Ginsberg, M., Israely, E., Palikuqi, B., Poulos, M. G., James, D., Ding, B. S., Schachterle, W., Liu, Y., Rosenwaks, Z., Butler, J. M., Xiang, J., Rafii, A., Shido, K., Rabbany, S. Y., Elemento, O., & Rafii, S. (2013, Jul 29). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev Cell*, 26(2), 204-219. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.017>

Nolasco, L. H., Turner, N. A., Bernardo, A., Tao, Z., Cleary, T. G., Dong, J. F., & Moake, J. L. (2005, Dec 15). Hemolytic uremic syndrome-associated Shiga toxins promote endothelial-cell secretion and impair ADAMTS13 cleavage of unusually large von Willebrand factor multimers. *Blood*, 106(13), 4199-4209. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2111>

Nymo, S., Gustavsen, A., Nilsson, P. H., Lau, C., Espesvik, T., & Mollnes, T. E. (2016, Mar 1). Human Endothelial Cell Activation by Escherichia coli and Staphylococcus aureus Is Mediated by TNF and IL-1beta Secondarily to Activation of C5 and CD14 in Whole Blood. *J Immunol*, 196(5), 2293-2299. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502220>

Nyugen, J., Agrawal, S., Gollapudi, S., & Gupta, S. (2010, Nov). Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J Clin Immunol*, 30(6), 806-813. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9448-8>

Oak, M. H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S. H., Lee, H. H., & Schini-Kerth, V. B. (2018, Jul). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radic Biol Med*, 122, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018>

Ohland, J., Warren-Gash, C., Blackburn, R., Molbak, K., Valentiner-Branth, P., Nielsen, J., & Emborg, H. D. (2020, Apr). Acute myocardial infarctions and stroke triggered by laboratory-confirmed respiratory infections in Denmark, 2010 to 2016. *Euro Surveill*, 25(17). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.17.1900199>

Oliveira, N. M., Rios, E. C. S., de Lima, T. M., Victorino, V. J., Barbeiro, H., Pinheiro da Silva, F., Szabo, C., & Soriano, F. G. (2017, Feb). Sepsis induces telomere shortening: a potential mechanism responsible for delayed pathophysiological events in sepsis survivors? *Mol Med*, 22, 886-891. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00225>

Olmos, G., Martinez-Miguel, P., Alcalde-Estevez, E., Medrano, D., Sosa, P., Rodriguez-Manas, L., Naves-Diaz, M., Rodriguez-Puyol, D., Ruiz-Torres, M. P., & Lopez-Ongil, S. (2017, Dec). Hyperphosphatemia induces senescence in human endothelial cells by increasing endothelin-1 production. *Aging Cell*, 16(6), 1300-1312. <https://doi.org/10.1111/ace.12664>

Onyema, O. O., Njemini, R., Bautmans, I., Renmans, W., De Waele, M., & Mets, T. (2012, Apr). Cellular aging and senescence characteristics of human T-lymphocytes. *Biogerontology*, 13(2), 169-181. <https://doi.org/10.1007/s10522-011-9366-z>

Ott, I., Miyagi, Y., Miyazaki, K., Heeb, M. J., Mueller, B. M., Rao, L. V., & Ruf, W. (2000, Mar). Reversible regulation of tissue factor-induced coagulation by glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(3), 874-882. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.3.874>

Pahwa, R., Devaraj, S., & Jialal, I. (2016, Jun). The effect of the accessory proteins, soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein on Toll-like receptor 4 activity in human monocytes and adipocytes. *Int J Obes (Lond)*, 40(6), 907-911. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.32>

Pak, A., Eisen, D. P., McBryde, E. S., & Adegbeye, O. A. (2021, Mar 25). Hospitalisation for lower respiratory tract infection is associated with an increased incidence of acute myocardial infarction and stroke in tropical Northern Australia. *Sci Rep*, 11(1), 6826. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86301-3>

Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2021, Mar). Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 21(3), 137-150. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0391-5>

Paoli, C. J., Reynolds, M. A., Sinha, M., Gitlin, M., & Crouser, E. (2018, Dec). Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med*, 46(12), 1889-1897. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003342>

Papagno, L., Spina, C. A., Marchant, A., Salio, M., Rufer, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., Dunbar, P. R., Shepherd, D., Cerundolo, V., Emery, V., Griffiths, P., Conlon, C., McMichael, A. J., Richman, D. D., Rowland-Jones, S. L., & Appay, V. (2004, Feb). Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*, 2(2), E20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020020>

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., & Campisi, J. (2003, Aug). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 5(8), 741-747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>

Parthasarathi, K. (2012, Jul 1). Endothelial connexin43 mediates acid-induced increases in pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(1), L33-42. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00219.2011>

Pasteur. (1881, Sep 3). On the Germ Theory. *Science*, 2(63), 420-422. <https://doi.org/10.1126/science.os-2.63.420>

Pawlinski, R., Pedersen, B., Schabbauer, G., Tencati, M., Holscher, T., Boisvert, W., Andrade-Gordon, P., Frank, R. D., & Mackman, N. (2004, Feb 15). Role of tissue factor and

protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*, 103(4), 1342-1347. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3051>

Pene, F., Grimaldi, D., Zuber, B., Sauneuf, B., Rousseau, C., El Hachem, C., Martin, C., Belaidouni, N., Balloy, V., Mira, J. P., & Chiche, J. D. (2012, Sep 15). Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction. *J Infect Dis*, 206(6), 932-942. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis438>

Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016, Dec). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, 15(6), 999-1017. <https://doi.org/10.1111/ace.12518>

Phua, J., Ngerng, W., See, K., Tay, C., Kiong, T., Lim, H., Chew, M., Yip, H., Tan, A., Khalizah, H., Capistrano, R., Lee, K., & Mukhopadhyay, A. (2013, Sep 12). Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit Care*, 17(5), R202. <https://doi.org/10.1186/cc12896>

Pignolo, R. J., Passos, J. F., Khosla, S., Tchkonia, T., & Kirkland, J. L. (2020, Jul). Reducing Senescent Cell Burden in Aging and Disease. *Trends Mol Med*, 26(7), 630-638. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.005>

Plenge, R. M., Scolnick, E. M., & Altshuler, D. (2013, Aug). Validating therapeutic targets through human genetics. *Nat Rev Drug Discov*, 12(8), 581-594. <https://doi.org/10.1038/nrd4051>

Potter, D. R., Jiang, J., & Damiano, E. R. (2009, Jun 5). The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circ Res*, 104(11), 1318-1325. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.191585>

Prauchner, C. A. (2017, May). Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns*, 43(3), 471-485. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.09.023>

Prescott, H. C., & Angus, D. C. (2018, Jan 2). Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA*, 319(1), 62-75. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17687>

Prest, J., Sathananthan, M., & Jeganathan, N. (2021, Aug 1). Current Trends in Sepsis-Related Mortality in the United States. *Crit Care Med*, 49(8), 1276-1284. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005017>

Pugin, J. (2012, Jul 12). How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-2-27>

Quenot, J. P., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J. C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., Perez, P., Kuteifan, K., Noirot, A., Badie, J., Mezher,

C., Lessire, H., & Pavon, A. (2013, Apr 25). The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care*, 17(2), R65. <https://doi.org/10.1186/cc12598>

Radeva, M. Y., & Waschke, J. (2018, Jan). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol (Oxf)*, 222(1). <https://doi.org/10.1111/apha.12860>

Rajapakse, A. G., Yepuri, G., Carvas, J. M., Stein, S., Matter, C. M., Scerri, I., Ruffieux, J., Montani, J. P., Ming, X. F., & Yang, Z. (2011, Apr 22). Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol. *PLoS One*, 6(4), e19237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019237>

Rajendran, P., Alzahrani, A. M., Hanieh, H. N., Kumar, S. A., Ben Ammar, R., Rengarajan, T., & Alhoot, M. A. (2019, Dec). Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. *J Cell Physiol*, 234(12), 21485-21492. <https://doi.org/10.1002/jcp.28895>

Ramirez, J., Aliberti, S., Mirsaeidi, M., Peyrani, P., Filardo, G., Amir, A., Moffett, B., Gordon, J., Blasi, F., & Bordon, J. (2008, Jul 15). Acute myocardial infarction in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*, 47(2), 182-187. <https://doi.org/10.1086/589246>

Ratliff, M., Alter, S., Frasca, D., Blomberg, B. B., & Riley, R. L. (2013, Apr). In senescence, age-associated B cells secrete TNFalpha and inhibit survival of B-cell precursors. *Aging Cell*, 12(2), 303-311. <https://doi.org/10.1111/acel.12055>

Rehm, M., Zahler, S., Lotsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Jacob, M., & Becker, B. F. (2004, May). Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*, 100(5), 1211-1223. <https://doi.org/10.1097/00000542-200405000-00025>

Reinhart, K., Daniels, R., Kissoon, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., & Finfer, S. (2017, Aug 3). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med*, 377(5), 414-417. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>

Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P. R. F., Troquay, R. P. T., Libby, P., Glynn, R. J., & Group, C. T. (2017, Sep 21). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 377(12), 1119-1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>

Rimmele, T., Payen, D., Cantaluppi, V., Marshall, J., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P., Kellum, J. A., & Workgroup, A. X. (2016, Mar). Immune Cell Phenotype and Function in Sepsis. *Shock*, 45(3), 282-291. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000495>

Rochette, P. J., & Brash, D. E. (2008, Apr). Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech Ageing Dev*, 129(4), 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.007>

Rodrigues, S. F., & Granger, D. N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, 3(1-2), e978720. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.978720>

Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L. A., Casalang-Verzosa, G., Zhu, Y., Schafer, M. J., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., & Miller, J. D. (2016, Oct). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15(5), 973-977. <https://doi.org/10.1111/acel.12458>

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdes-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., Tusche, M. W., Pavlov, V. A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T. W., & Tracey, K. J. (2011, Oct 7). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*, 334(6052), 98-101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>

Rossiello, F., Herbig, U., Longhese, M. P., Fumagalli, M., & d'Adda di Fagagna, F. (2014, Jun). Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev*, 26, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.06.009>

Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R. T., Gillis, J. Z., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2011, Aug 4). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, 118(5), 1305-1315. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>

Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kissoon, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., Lozano, R., Lopez, A. D., Angus, D. C., Murray, C. J. L., & Naghavi, M. (2020, Jan 18). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 395(10219), 200-211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

Ruparelia, N., & Choudhury, R. (2020, Jan). Inflammation and atherosclerosis: what is on the horizon? *Heart*, 106(1), 80-85. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2018-314230>

Russell, J. A., Lee, T., Singer, J., Boyd, J. H., Walley, K. R., Vasopressin, & Septic Shock Trial, G. (2017, Jun). The Septic Shock 3.0 Definition and Trials: A Vasopressin and Septic Shock Trial Experience. *Crit Care Med*, 45(6), 940-948. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002323>

Ryu, Y. S., Kang, K. A., Piao, M. J., Ahn, M. J., Yi, J. M., Bossis, G., Hyun, Y. M., Park, C. O., & Hyun, J. W. (2019, Sep 24). Particulate matter-induced senescence of skin

keratinocytes involves oxidative stress-dependent epigenetic modifications. *Exp Mol Med*, 51(9), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0305-4>

Sakr, Y., Dubois, M. J., De Backer, D., Creteur, J., & Vincent, J. L. (2004, Sep). Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 32(9), 1825-1831. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000138558.16257.3f>

Sakula, A. (1979, Oct). Pierre Adolphe Piorry (1794-1879): pioneer of percussion and pleximetry. *Thorax*, 34(5), 575-581. <https://doi.org/10.1136/thx.34.5.575>

Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Cordoba, L., Punzon, C., Llamas, M. A., & Fresno, M. (2016, Jun). Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacol Res*, 108, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.038>

Sanson, P., Vescovini, R., Fagnoni, F., Biasini, C., Zanni, F., Zanlari, L., Telera, A., Lucchini, G., Passeri, G., Monti, D., Franceschi, C., & Passeri, M. (2008, Feb). The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*, 43(2), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.06.008>

Sasaki, M., Kumazaki, T., Takano, H., Nishiyama, M., & Mitsui, Y. (2001, Oct). Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev*, 122(15), 1695-1706. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00281-0](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00281-0)

Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Duperrier, A., Keller, M., Grubeck-Loebenstein, B., Ferrand, C., Debre, P., Sidi, D., & Appay, V. (2009, Oct). Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*, 119(10), 3070-3078. <https://doi.org/10.1172/JCI39269>

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017, Mar 9). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>

Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002, Feb). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*, 3(2), 143-150. <https://doi.org/10.1038/ni749>

Schmid, A., Burchardi, H., Clouth, J., & Schneider, H. (2002). Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ*, 3(2), 77-82. <https://doi.org/10.1007/s10198-002-0095-8>

Schmid, A., Pugin, J., Chevrolet, J. C., Marsch, S., Ludwig, S., Stocker, R., & Finnern, H. (2004, Feb 21). Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. *Swiss Med Wkly*, 134(7-8), 97-102. <https://doi.org/2004/07/smw-10475>

Schmidt, E. P., Yang, Y., Janssen, W. J., Gandjeva, A., Perez, M. J., Barthel, L., Zemans, R. L., Bowman, J. C., Koyanagi, D. E., Yunt, Z. X., Smith, L. P., Cheng, S. S., Overdier, K. H., Thompson, K. R., Geraci, M. W., Douglas, I. S., Pearse, D. B., & Tuder, R. M. (2012, Aug).

The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med*, 18(8), 1217-1223. <https://doi.org/10.1038/nm.2843>

Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & van der Poll, T. (2008, Mar). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 83(3), 536-545. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>

Semple, J. W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E. R., & Freedman, J. (2007, Jun 1). Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*, 109(11), 4803-4805. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-062695>

Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., Rea, T. D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J. M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C. S., Escobar, G. J., & Angus, D. C. (2016, Feb 23). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 762-774. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>

Shankar-Hari, M., Saha, R., Wilson, J., Prescott, H. C., Harrison, D., Rowan, K., Rubenfeld, G. D., & Adhikari, N. K. J. (2020, Apr). Rate and risk factors for rehospitalisation in sepsis survivors: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*, 46(4), 619-636. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05908-3>

Shay, J. W., & Wright, W. E. (2019, May). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*, 20(5), 299-309. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>

Shen, H. N., Lu, C. L., & Yang, H. H. (2016, Oct). Risk of Recurrence After Surviving Severe Sepsis: A Matched Cohort Study. *Crit Care Med*, 44(10), 1833-1841. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001824>

Sidler, C., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2017). Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Front Genet*, 8, 138. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00138>

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, Feb 23). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801-810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Smadja, D. M., Mauge, L., Sanchez, O., Silvestre, J. S., Guerin, C., Godier, A., Henno, P., Gaussem, P., & Israel-Biet, D. (2010, Dec). Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 36(6), 1284-1293. <https://doi.org/10.1183/09031936.00130809>

Smeeth, L., Thomas, S. L., Hall, A. J., Hubbard, R., Farrington, P., & Vallance, P. (2004, Dec 16). Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med*, 351(25), 2611-2618. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041747>

Song, S., Lam, E. W., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., & Sun, Y. (2020, Jul). Senescent Cells: Emerging Targets for Human Aging and Age-Related Diseases. *Trends Biochem Sci*, 45(7), 578-592. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.03.008>

Spink, J., Cohen, J., & Evans, T. J. (1995, Dec 8). The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 270(49), 29541-29547. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29541>

Spodick, D. H., Flessas, A. P., & Johnson, M. M. (1984, Feb 1). Association of acute respiratory symptoms with onset of acute myocardial infarction: prospective investigation of 150 consecutive patients and matched control patients. *Am J Cardiol*, 53(4), 481-482. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(84\)90016-x](https://doi.org/10.1016/0002-9149(84)90016-x)

Stasi, A., Intini, A., Divella, C., Franzin, R., Montemurno, E., Grandaliano, G., Ronco, C., Fiacchadori, E., Pertosa, G. B., Gesualdo, L., & Castellano, G. (2017, Jan 1). Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*, 32(1), 24-31. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw250>

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., & Keyes, W. M. (2013, Nov 21). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>

Studt, J. D., Kremer Hovinga, J. A., Antoine, G., Hermann, M., Rieger, M., Scheiflinger, F., & Lammle, B. (2005, Jan 15). Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*, 105(2), 542-544. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2096>

Subramani, J., Leo, M. D., Kathirvel, K., Arunadevi, R., Singh, T. U., Prakash, V. R., & Mishra, S. K. (2010, Mar 25). Essential role of nitric oxide in sepsis-induced impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in rat pulmonary artery. *Eur J Pharmacol*, 630(1-3), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.12.026>

Sun, N., Youle, R. J., & Finkel, T. (2016, Mar 3). The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*, 61(5), 654-666. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.028>

Sun, Y., Coppe, J. P., & Lam, E. W. (2018, Oct). Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med*, 24(10), 871-885. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.002>

Syrjanen, J., Valtonen, V. V., Iivanainen, M., Kaste, M., & Huttunen, J. K. (1988, Apr 23). Preceding infection as an important risk factor for ischaemic brain infarction in young and middle aged patients. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 296(6630), 1156-1160. <https://doi.org/10.1136/bmj.296.6630.1156>

Szotowski, B., Antoniak, S., & Rauch, U. (2006, Jul). Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc Med*, 16(5), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.03.005>

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010, Mar 19). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

Tapia, P., Gatica, S., Cortes-Rivera, C., Otero, C., Becerra, A., Riedel, C. A., Cabello-Verrugio, C., Kalergis, A. M., & Simon, F. (2019, Jul). Circulating Endothelial Cells From Septic Shock Patients Convert to Fibroblasts Are Associated With the Resuscitation Fluid Dose and Are Biomarkers for Survival Prediction. *Crit Care Med*, 47(7), 942-950. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003778>

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013, Mar). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 123(3), 966-972. <https://doi.org/10.1172/JCI64098>

Thomas, L. (1972, Sep 14). Germs. *N Engl J Med*, 287(11), 553-555. <https://doi.org/10.1056/NEJM197209142871109>

Thomas, M. R., & Storey, R. F. (2015, Aug 31). The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*, 114(3), 449-458. <https://doi.org/10.1160/TH14-12-1067>

Thorndike, J., & Kollef, M. H. (2020, Oct). Culture-negative sepsis. *Curr Opin Crit Care*, 26(5), 473-477. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000751>

Tiru, B., DiNino, E. K., Orenstein, A., Mailloux, P. T., Pesaturo, A., Gupta, A., & McGee, W. T. (2015, Sep). The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis. *Pharmacoconomics*, 33(9), 925-937. <https://doi.org/10.1007/s40273-015-0282-y>

Toussaint, O., Medrano, E. E., & von Zglinicki, T. (2000, Oct). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 35(8), 927-945. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00180-7)

Ungvari, Z., Tucsek, Z., Sosnowska, D., Toth, P., Gautam, T., Podlutsky, A., Csiszar, A., Losonczy, G., Valcarcel-Ares, M. N., Sonntag, W. E., & Csiszar, A. (2013, Aug). Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebromicrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(8), 877-891. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls242>

Uryga, A. K., & Bennett, M. R. (2016, Apr 15). Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *J Physiol*, 594(8), 2115-2124. <https://doi.org/10.1113/JP270923>

van den Berg, B. M., Vink, H., & Spaan, J. A. (2003, Apr 4). The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res*, 92(6), 592-594. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000065917.53950.75>

van der Slikke, E. C., An, A. Y., Hancock, R. E. W., & Bouma, H. R. (2020, Nov). Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. *EBioMedicine*, 61, 103044. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103044>

Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L. F., Kocher, O., & Dvorak, H. F. (2001, Feb). Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J*, 15(2), 458-466. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0051com>

Verbist, K. C., Wang, R., & Green, D. R. (2012, Dec). T cell metabolism and the immune response. *Semin Immunol*, 24(6), 399-404. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.12.006>

Verdant, C. L., De Backer, D., Bruhn, A., Clausi, C. M., Su, F., Wang, Z., Rodriguez, H., Pries, A. R., & Vincent, J. L. (2009, Nov). Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit Care Med*, 37(11), 2875-2881. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181b029c1>

Verstraete, S., Vanhorebeek, I., van Puffelen, E., Derese, I., Ingels, C., Verbruggen, S. C., Wouters, P. J., Joosten, K. F., Hanot, J., Guerra, G. G., Vlasselaers, D., Lin, J., & Van den Berghe, G. (2018, Feb 21). Leukocyte telomere length in paediatric critical illness: effect of early parenteral nutrition. *Crit Care*, 22(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1972-6>

Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., & Strasser, A. (2003, Nov 7). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302(5647), 1036-1038. <https://doi.org/10.1126/science.1090072>

Vincent, J. L., Jones, G., David, S., Olariu, E., & Cadwell, K. K. (2019, May 31). Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 23(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2478-6>

Vincent, J. L., Marshall, J. C., Namendys-Silva, S. A., Francois, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., Reinhart, K., Antonelli, M., Pickkers, P., Njimi, H., Jimenez, E., Sakr, Y., & investigators, I. (2014, May). Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*, 2(5), 380-386. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70061-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70061-X)

Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M., & Thijs, L. G. (1996, Jul). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22(7), 707-710. <https://doi.org/10.1007/BF01709751>

Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., & Tracey, K. J. (2013, Mar 2). Sepsis definitions: time for change. *Lancet*, 381(9868), 774-775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61815-7)

Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., & Investigators, E. I. G. o. (2009, Dec 2). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302(21), 2323-2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>

Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R., Payen, D., & Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients, I. (2006, Feb). Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 34(2), 344-353. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000194725.48928.3a>

Vion, A. C., Kheloufi, M., Hammoutene, A., Poisson, J., Lasselin, J., Devue, C., Pic, I., Dupont, N., Busse, J., Stark, K., Lafaurie-Janvore, J., Barakat, A. I., Loyer, X., Souyri, M., Viollet, B., Julia, P., Tedgui, A., Codogno, P., Boulanger, C. M., & Rautou, P. E. (2017, Oct 10). Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(41), E8675-E8684. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>

Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., Lewis, T. T., Lichtman, J. H., Longenecker, C. T., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Martin, S. S., Matsushita, K., Moran, A. E., Mussolino, M. E., Perak, A. M., Rosamond, W. D., Roth, G. A., Sampson, U. K. A., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Shay, C. M., Spartano, N. L., Stokes, A., Tirschwell, D. L., VanWagner, L. B., Tsao, C. W., American Heart Association Council on, E., Prevention Statistics, C., & Stroke Statistics, S. (2020, Mar 3). Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9), e139-e596. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757>

Walaszczyk, A., Dookun, E., Redgrave, R., Tual-Chalot, S., Victorelli, S., Spyridopoulos, I., Owens, A., Arthur, H. M., Passos, J. F., & Richardson, G. D. (2019, Jun). Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction. *Aging Cell*, 18(3), e12945. <https://doi.org/10.1111/ace.12945>

Wang, E. (1995, Jun 1). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res*, 55(11), 2284-2292. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7757977>

Wang, H. E., Kabeto, M. M., Gray, M., Wadley, V. G., Muntner, P., Judd, S. E., Safford, M. M., Kempker, J., & Levine, D. A. (2021, Jul 1). Trajectory of Cognitive Decline After Sepsis. *Crit Care Med*, 49(7), 1083-1094. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004897>

Wang, M., Kim, S. H., Monticone, R. E., & Lakatta, E. G. (2015, Apr). Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension*, 65(4), 698-703. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03618>

Wang, T., Derhovanessian, A., De Cruz, S., Belperio, J. A., Deng, J. C., & Hoo, G. S. (2014, Mar-Apr). Subsequent infections in survivors of sepsis: epidemiology and outcomes. *J Intensive Care Med*, 29(2), 87-95. <https://doi.org/10.1177/0885066612467162>

Warboys, C. M., de Luca, A., Amini, N., Luong, L., Duckles, H., Hsiao, S., White, A., Biswas, S., Khamis, R., Chong, C. K., Cheung, W. M., Sherwin, S. J., Bennett, M. R., Gil, J., Mason, J. C., Haskard, D. O., & Evans, P. C. (2014, May). Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(5), 985-995. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303415>

Watson, C., Whittaker, S., Smith, N., Vora, A. J., Dumonde, D. C., & Brown, K. A. (1996, Jul). IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 105(1), 112-119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-717.x>

Weinbaum, S., Tarbell, J. M., & Damiano, E. R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 121-167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>

Williams-Gray, C. H., Wijeyekoon, R. S., Scott, K. M., Hayat, S., Barker, R. A., & Jones, J. L. (2018, May 28). Abnormalities of age-related T cell senescence in Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 15(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1206-5>

Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., Taubenschmid, J., Hammerle, M., Esk, C., Bagley, J. A., Lindenhofer, D., Chen, G., Boehm, M., Agu, C. A., Yang, F., Fu, B., Zuber, J., Knoblich, J. A., Kerjaschki, D., & Penninger, J. M. (2019, Jan). Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature*, 565(7740), 505-510. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0858-8>

Winters, B. D., Eberlein, M., Leung, J., Needham, D. M., Pronovost, P. J., & Sevransky, J. E. (2010, May). Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*, 38(5), 1276-1283. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d>

Wolf, D., & Ley, K. (2019, Jan 18). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*, 124(2), 315-327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>

Woywodt, A., Bahlmann, F. H., De Groot, K., Haller, H., & Haubitz, M. (2002, Oct). Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*, 17(10), 1728-1730. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.10.1728>

Woywodt, A., Streiber, F., de Groot, K., Regelsberger, H., Haller, H., & Haubitz, M. (2003, Jan 18). Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet*, 361(9353), 206-210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12269-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12269-6)

Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogorodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., Singh, R. J., Allison, D. B., Ejima, K., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Cubro, H., Garovic, V. D., Hou, X., Weroha, S. J., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., Khosla, S., Tchkonia, T., & Kirkland, J. L. (2018, Aug). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, 24(8), 1246-1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>

Xu, W., & Larbi, A. (2017, Aug 10). Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081742>

Yang, D., McCrann, D. J., Nguyen, H., St Hilaire, C., DePinho, R. A., Jones, M. R., & Ravid, K. (2007, Apr). Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence. *Aging Cell*, 6(2), 257-260. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00274.x>

Yang, N., & Sen, P. (2018, Nov 3). The senescent cell epigenome. *Aging (Albany NY)*, 10(11), 3590-3609. <https://doi.org/10.18632/aging.101617>

Yang, N. C., & Hu, M. L. (2004, Feb 15). A fluorimetric method using fluorescein di-beta-D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated beta-galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Anal Biochem*, 325(2), 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.012>

Yap, K. L., Li, S., Munoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M. J., & Zhou, M. M. (2010, Jun 11). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*, 38(5), 662-674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.021>

Yende, S., Linde-Zwirble, W., Mayr, F., Weissfeld, L. A., Reis, S., & Angus, D. C. (2014, May 1). Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 189(9), 1065-1074. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1321OC>

Yoo, J. W., Moon, J. Y., Hong, S. B., Lim, C. M., Koh, Y., & Huh, J. W. (2015, Jun). Clinical significance of circulating endothelial cells in patients with severe sepsis or septic

shock. *Infect Dis (Lond)*, 47(6), 393-398.
<https://doi.org/10.3109/00365548.2014.1001999>

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., & Krizhanovsky, V. (2016, Apr 6). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*, 7, 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>

Yu, H. M., Zhao, Y. M., Luo, X. G., Feng, Y., Ren, Y., Shang, H., He, Z. Y., Luo, X. M., Chen, S. D., & Wang, X. Y. (2012). Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells. *Neuroimmunomodulation*, 19(2), 131-136. <https://doi.org/10.1159/000330254>

Yu, S., Wang, X., Geng, P., Tang, X., Xiang, L., Lu, X., Li, J., Ruan, Z., Chen, J., Xie, G., Wang, Z., Ou, J., Peng, Y., Luo, X., Zhang, X., Dong, Y., Pang, X., Miao, H., Chen, H., & Liang, H. (2017, Aug). Melatonin regulates PARP1 to control the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fetal lung fibroblast cells. *J Pineal Res*, 63(1). <https://doi.org/10.1111/jpi.12405>

Zacca, E. R., Crespo, M. I., Acland, R. P., Roselli, E., Nunez, N. G., Maccioni, M., Maletto, B. A., Pistoresi-Palencia, M. C., & Moron, G. (2015). Aging Impairs the Ability of Conventional Dendritic Cells to Cross-Prime CD8+ T Cells upon Stimulation with a TLR7 Ligand. *PLoS One*, 10(10), e0140672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140672>

Zanoni, I., & Granucci, F. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 32. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>

Zardi, E. M., Zardi, D. M., Dobrina, A., & Afeltra, A. (2007, Feb). Prostacyclin in sepsis: a systematic review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 83(1-2), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.12.004>

Zhan, J. K., Wang, Y. J., Li, S., Wang, Y., Tan, P., He, J. Y., Chen, Y. Y., Deng, H. Q., Huang, W., Lin, X., & Liu, Y. S. (2018, Dec). AMPK/TSC2/mTOR pathway regulates replicative senescence of human vascular smooth muscle cells. *Exp Ther Med*, 16(6), 4853-4858. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6767>

Zhang, J., He, T., Xue, L., & Guo, H. (2021, Jun). Senescent T cells: a potential biomarker and target for cancer therapy. *EBioMedicine*, 68, 103409. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103409>

Zhang, W., Ji, W., Yang, J., Yang, L., Chen, W., & Zhuang, Z. (2008, Sep 26). Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence. *Life Sci*, 83(13-14), 475-480. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.07.015>

Zhao, M., & Chen, X. (2015, Aug 15). Effect of lipopolysaccharides on adipogenic potential and premature senescence of adipocyte progenitors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(4), E334-344. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00601.2014>

Zhong, L., Simard, M. J., & Huot, J. (2018, Aug). Endothelial microRNAs regulating the NF-kappaB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J*, 32(8), 4070-4084. <https://doi.org/10.1096/fj.201701536R>

Zhou, J., Freeman, T. A., Ahmad, F., Shang, X., Mangano, E., Gao, E., Farber, J., Wang, Y., Ma, X. L., Woodgett, J., Vagnozzi, R. J., Lal, H., & Force, T. (2013, Apr). GSK-3alpha is a central regulator of age-related pathologies in mice. *J Clin Invest*, 123(4), 1821-1832. <https://doi.org/10.1172/JCI64398>

Zlamy, M., Almanzar, G., Parson, W., Schmidt, C., Leierer, J., Weinberger, B., Jeller, V., Unsinn, K., Eyrich, M., Wurzner, R., & Prelog, M. (2016). Efforts of the human immune system to maintain the peripheral CD8+ T cell compartment after childhood thymectomy. *Immun Ageing*, 13, 3. <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0058-z>

Zorio, V., Venet, F., Delwarde, B., Floccard, B., Marcotte, G., Textoris, J., Monneret, G., & Rimmele, T. (2017, Dec). Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. *Ann Intensive Care*, 7(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0304-3>

Annexes

A translational investigation of interferon- α and STAT1 signaling in endothelial cells during septic shock provides therapeutic perspectives

Raphaël Clere-Jehl, **Hamid Merdji**, Mohamad Kassem, Cécile Macquin, Aurore De Cauwer, Alicia Sibony, Kei Kurihara, Laetitia Minniti, Chérine Abou Fayçal, Seiamak Bahram, Ferhat Meziani, Julie Helms, Philippe Georgel.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2021 Aug;65(2):167-175. doi: 10.1165/rcmb.2020-0401OC. PMID: 33798037.

Notre article explore le rôle joué par les interférons de type I dans l'activation et la dysfonction endothéliales au cours du choc septique et notamment dans la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

La partie d'expérimentation animale rapporte les résultats obtenus dans un modèle murin de choc septique (CLP), chez des souris présentant un déficit génétique total en récepteur des interférons de type I (*Ifnar1-/-*). Ce travail confirme que les souris déficientes en récepteur IFNAR1 sont protégées face au choc septique. Une analyse de l'expression des gènes associés à l'activation et à la dysfonction endothéliales au niveau des tissus aortiques par qPCR a mis en évidence que le déficit en IFNAR1 est associé à une franche diminution de l'expression des gènes codant pour les molécules d'activation endothéliale, telles qu'ICAM-1.

En inhibant la voie de signalisation (STAT1) des IFNs de type I, de façon ciblée sur l'endothélium vasculaire au cours du choc septique les souris montraient une résistance face au choc septique. Cette inhibition spécifique a été réalisée par croisement de manière à obtenir une lignée de souris de type CreLox, présentant un déficit en protéine STAT1 de façon élective sur l'endothélium et inductible par tamoxifène.

De manière à évaluer la transposition de ces résultats chez l'homme, il a été mis en évidence que parmi tous les types (I, II, III) et sous-types d'interférons dosés, seuls l'IFN- α et son sous-type $\alpha 1$ ont montré une corrélation avec la survenue de la CIVD d'une part et avec le dosage plasmatique des microparticules endothéliales circulantes dans le plasma d'autre part. Ces résultats ont confirmé, chez l'Homme, le rôle potentiel des IFNs de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique.

En conclusion, nous avons confirmé dans ce travail le rôle des interférons de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique, chez la souris et chez l'Homme, et l'effet protecteur conféré par leur inhibition ciblée sur l'endothélium. De façon complémentaire, nous avons montré le même type d'effet protecteur de l'inhibition de leur voie de signalisation (STAT1) ciblée sur l'endothélium, permettant d'ouvrir les perspectives thérapeutiques sur une utilisation des jakinibs ciblée sur l'endothélium.

Sepsis inhibits tumor growth in mice with cancer through Toll-like receptor 4-associated enhanced Natural Killer cell activity

Clara Vigneron, Adrien Mirouse, **Hamid Merdji**, Christophe Rousseau,
Clément Cousin, Fanny Alby-Laurent, Jean-Paul Mira, Jean-Daniel Chiche,
Jean-François Llitjos & Frédéric Pène

Oncoimmunology. 2019 Jul 19;8(11):e1641391. doi: 10.1080/2162402X.2019.1641391.
PMID: 31646090; PMCID: PMC6791422.

Notre article explore l'impact des dysfonctionnements immunitaires induits par le sepsis sur la croissance des tumeurs malignes solides.

Dans ce travail expérimental, nous avons évalué l'impact du sepsis sur un cancer solide préexistant, à travers un modèle expérimental séquentiel reposant sur l'établissement d'un cancer dans un premier temps, suivi par un choc septique chez des souris de type sauvage (WT) dans un second temps. Ainsi, des souris préalablement inoculées par des cellules de fibrosarcome (MCA205), que ce soit en intraveineux ou en sous-cutané, ont été soumises à un choc septique par péricitone polymicrobien induit par ligature et ponction caecale (CLP) ou à un choc endotoxique par inoculation intraperitoneale de lipopolysaccharide (LPS).

Les résultats ont mis en évidence que le choc septique polymicrobien de type CLP freine la croissance des tumeurs malignes chez les souris WT, mais pas chez les souris TLR4 (Toll-like receptor 4) $-/-$, ni chez les souris Myd88 $-/-$. Une inhibition similaire de la croissance tumorale a été observée lors d'une endotoxémie au LPS, ce qui suggère un rôle régulateur de TLR4 dans ce contexte.

La faible expression du CMH de classe 1 sur les cellules cancéreuses de fibrosarcome a suggéré l'implication des cellules Natural Killer (NK), l'une des cellules immunitaires tumoricides principales, dans l'inhibition tumorale induite par le sepsis. Les différents types de stimulation septique appliquées à des souris atteintes de cancer ont favorisé les principales fonctions anti-tumorales des NK que sont la production d'IFN γ et la dégranulation. Les propriétés anti-tumorales des cellules NK obtenues à partir de souris septiques étaient exacerbées lorsqu'elles étaient cultivées avec des cellules de fibrosarcome (MCA205) ou des cellules de lymphome murin (YAC-1), toutes deux pauvres en CMH1.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le sepsis peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance tumorale lorsqu'il survient chez des souris atteintes d'un cancer par un mécanisme dépendant des TLR4 en renforçant les fonctions anti-tumorales des cellules NK. Ces résultats pourraient renouveler l'intérêt pour l'immunothérapie bactérienne anticancéreuse, actuellement limitée à la BCG thérapie dans le cadre du traitement du cancer de la vessie, consistant en l'instillation intra-vésicale du bacille *Mycobacterium bovis* atténué.

Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, improves septic shock induced arterial dysfunction in rats

Alexandra Boivin, Mélanie Burban, Raphael Clere-Jehl, Pierrick Le Borgne,

Hamid Merdji, Cyril Auger, Valérie Schini-Kerth, Ferhat Meziani, Julie Helms

PLoS One. 2017 Dec 20;12(12):e0189658. doi: 10.1371/journal.pone.0189658. PMID: 29261735; PMCID: PMC5738044.

Notre article explore l'impact de la supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne, tels l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), au cours de la dysfonction vasculaire induite par le choc septique.

Dans un modèle de choc septique par péritonite polymicrobienne induite par ligature et ponction caecale (CLP), des rats ont été perfusés avec de l'EPA, du DHA, un mélange EPA/DHA ou 5% de dextrose (D5).

Chez les rats septiques, les besoins en noradrénaline étaient significativement réduits dans les groupes DHA et EPA/DHA par rapport au groupe perfusé par D5. La perfusion de DHA améliorait significativement la réponse contractile à la phénylephrine par l'inhibition de la voie du NO. Le DHA a en outre réduit de manière significative le stress oxydatif vasculaire et la production de NO, l'expression de I_KB phosphorylée et la production de prostaglandines vasodilatatrices. Le DHA a enfin diminué de manière significative les médiateurs pro-inflammatoires des acides gras polyinsaturés et augmenté de manière significative plusieurs métabolites anti-inflammatoires.

En conclusion, la perfusion de DHA chez des rats améliore le dysfonctionnement hémodynamique survenant lors du choc septique grâce à une diminution du stress oxydatif vasculaire et de l'inflammation. Tandis que la perfusion d'EPA n'a aucun effet bénéfique sur ces paramètres. Ainsi, la supplémentation en DHA pourrait être une thérapie d'immunonutrition adjuvante prometteuse au cours du choc septique, qui mériterait des études plus approfondies chez l'homme.

Impact de la sénescence endothéliale et leucocytaire dans le choc septique

Résumé

Parmi les conséquences à long terme du sepsis (également appelé "syndrome post-sepsis"), l'augmentation du risque de développer des complications cardiovasculaires inexpliquées et/ou un épisode infectieux récurrent sont des préoccupations émergentes. Ces complications expliquent en grande partie la morbi-mortalité chez les survivants d'un choc septique.

Récemment, la sénescence, définie comme l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, a été identifiée comme un mécanisme de dysfonction cellulaire qui perdure dans le temps. Habituellement liée à l'âge lorsqu'il s'agit de sénescence réplicative, elle peut aussi être « induite » de manière « prématuée » par un stress majeur. Ainsi, une sénescence prématuée induite par le choc septique au niveau du système cardio-vasculaire et immunitaire pourrait en partie contribuer à la physiopathologie et aux conséquences à long terme du syndrome post-sepsis.

Ce travail de thèse a pour objectif d'appréhender les relations potentielles entre le sepsis et la sénescence prématuée induite (ou sénescence accélérée). En particulier, les mécanismes cellulaires clés contribuant aux infections récurrentes et aux événements cardiovasculaires chez des patients convalescents déjà lourdement affectés par un choc septique. Les principaux résultats de nos travaux sont que le sepsis induit un dysfonctionnement artériel avec une acquisition *in situ*, dépendante du temps, d'un phénotype d'inflammation et de sénescence dans les artères de conduction et de résistance, ce qui indique un effet systémique persistant pouvant expliquer en partie la physiopathologie des conséquences cardio-vasculaires à long terme.

Mots clés : sepsis, choc septique, complications cardio-vasculaires, sénescence, immunosénescence

Résumé en anglais

Among the long-term consequences of sepsis (also called "post-sepsis syndrome"), the increased risk of developing unexplained cardiovascular complications and/or a recurrent infectious episode are emerging concerns. These complications account for much of the morbidity and mortality in survivors of septic shock.

Recently, senescence, defined as irreversible cell cycle arrest, has been identified as a mechanism of cell dysfunction that persists over time. Usually linked to age when it is replicative senescence, it can also be "induced" in a "premature" way by a major stress. Thus, premature senescence induced by septic shock at the level of the cardiovascular and immune system could partly contribute to the pathophysiology and long-term consequences of the post-sepsis syndrome.

The aim of our work is to understand the potential relationship between sepsis and induced premature senescence (or accelerated senescence). In particular, the key cellular mechanisms contributing to recurrent infections and cardiovascular events in convalescent patients already heavily affected by sepsis. The main finding of our work is that sepsis induced arterial dysfunction with a time dependent *in situ* acquisition of inflammation and senescence phenotype in both conductance and resistance arteries, therefore pointing at a systemic long-lasting effect that may partly explain the pathophysiology of long-term cardiovascular consequences.

Key words: sepsis, septic shock, cardiovascular complications, senescence, immunosenescence