



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

---

**École Doctorale BioSE – Biologie Santé Environnement**

**THÈSE**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ**

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

**Par Benjamin HAAS**

**BIOMARQUEURS PRONOSTIQUES ET CIBLES  
THÉRAPEUTIQUES DU REMODELAGE VENTRICULAIRE  
POST INFARCTUS DU MYOCARDE**

**Le Mercredi 07 Décembre 2011**

**Membres du Jury :**

**Rapporteurs :** Florence PINET, PhD (INSERM, Lille)  
Jane-Lise SAMUEL, MD, PhD (INSERM, Paris)

**Examineurs :** Athanase VISVIKIS, PhD (UHP-CNRS Nancy)  
Daniel R. WAGNER, MD, PhD (Centre Hospitalier Luxembourg)

**Directeur de thèse :** Yvan DEVAUX, PhD (UHP-CRP-Santé, Nancy-Luxembourg)





*Vous me dites, Monsieur, que j'ai mauvaise mine,  
Qu'avec cette vie que je mène, je me ruine,  
Que l'on ne gagne rien à trop se prodiguer,  
Vous me dites enfin que je suis fatigué.*

*Oui je suis fatigué, Monsieur, et je m'en flatte.  
J'ai tout de fatigué, la voix, le cœur, la rate,  
Je m'endors épuisé, je me réveille las,  
Mais grâce à Dieu, Monsieur, je ne m'en soucie pas.  
Ou quand je m'en soucie, je me ridiculise.  
La fatigue souvent n'est qu'une vantardise.  
On n'est jamais aussi fatigué qu'on le croit !  
Et quand cela serait, n'en a-t-on pas le droit ?*

*Je ne vous parle pas des sombres lassitudes,  
Qu'on a lorsque le corps harassé d'habitude,  
N'a plus pour se mouvoir que de pâles raisons...  
Lorsqu'on a fait de soi son unique horizon...  
Lorsqu'on a rien à perdre, à vaincre, ou à défendre...  
Cette fatigue-là est mauvaise à entendre ;  
Elle fait le front lourd, l'œil morne, le dos rond.  
Et vous donne l'aspect d'un vivant moribond...*

*Mais se sentir plier sous le poids formidable  
Des vies dont un beau jour on s'est fait responsable,  
Savoir qu'on a des joies ou des pleurs dans ses mains,  
Savoir qu'on est l'outil, qu'on est le lendemain,  
Savoir qu'on est le chef, savoir qu'on est la source,  
Aider une existence à continuer sa course,  
Et pour cela se battre à s'en user le cœur...  
Cette fatigue-là, Monsieur, c'est du bonheur.*

*Et sûr qu'à chaque pas, à chaque assaut qu'on livre,  
On va aider un être à vivre ou à survivre ;  
Et sûr qu'on est le port et la route et le quai,  
Où prendrait-on le droit d'être trop fatigué ?  
Ceux qui font de leur vie une belle aventure,  
Marquant chaque victoire, en creux, sur la figure,  
Et quand le malheur vient y mettre un creux de plus  
Parmi tant d'autres creux il passe inaperçu.*

*La fatigue, Monsieur, c'est un prix toujours juste,  
C'est le prix d'une journée d'efforts et de luttes.  
C'est le prix d'un labeur, d'un mur ou d'un exploit,  
Non pas le prix qu'on paie, mais celui qu'on reçoit.  
C'est le prix d'un travail, d'une journée remplie,  
C'est la preuve, Monsieur, qu'on marche avec la vie.*

*Quand je rentre la nuit et que ma maison dort,  
J'écoute mes sommeils, et là, je me sens fort ;  
Je me sens tout gonflé de mon humble souffrance,  
Et ma fatigue alors est une récompense.*

*Et vous me conseillez d'aller me reposer !  
Mais si j'acceptais là, ce que vous me proposez,  
Si j'abandonnais à votre douce intrigue...  
Mais je mourrais, Monsieur, tristement... de fatigue.*

**Robert Lamoureux, L'éloge de la fatigue**

*à Camille, ma tendresse*

# Remerciements

Je remercie tout particulièrement le Docteur Daniel Wagner pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire, pour sa confiance et son soutien.

J'exprime mon plus grand respect et toute ma considération au Docteur Yvan Devaux, pour avoir supervisé mon travail, pour m'avoir soutenu et pour avoir été véritablement un mentor pour moi.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Docteurs Florence Pinet et Jane-Lise Samuel pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'au Professeur Athanase Visvikis pour avoir cordialement accepté d'être examinateur.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Mes plus sincères remerciements à mes collaborateurs directs.

Je remercie cordialement les membres de la plate-forme protéomique du Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann et plus particulièrement Sébastien Planchon pour sa compétence et sa gentillesse.

Je remercie le Fonds National de la Recherche, ainsi que le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg, pour m'avoir attribué une bourse de thèse et pour m'avoir permis de contribuer au rayonnement de la recherche luxembourgeoise.

Enfin j'adresse mes remerciements à tous les membres du Centre de Recherche Public-Santé.

# Liste des travaux

## **Publications présentées dans ce mémoire**

**Proteomic analysis of plasma proteins identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker in acute myocardial infarction patients.**

Haas B, Serchi T, Gilson G, Planchon S, Renaut J, Wagner DR, Bohn T, Devaux Y.  
*J Proteomics*. 2011 Jul 15. [Epub ahead of print]

**Adenosine Reduces Cell Surface Expression of Toll-Like Receptor 4 and Inflammation in Response to Lipopolysaccharide and Matrix Products.**

Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR.  
*J Cardiovasc Transl Res*. 2011 May 3. [Epub ahead of print]

**Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages.**

Velot E, Haas B, Léonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR.  
*Cardiovasc Res*. 2008 Nov 1; 80(2):246-54.

## **Posters**

**Adenosine prevents toll-like receptor 4 activation. Implication for limitation of left ventricular remodeling.**

Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR.  
European Society of Cardiology Congress, Paris, Août 2011

**Adenosine reduces cell-surface expression of Toll-like receptor 4 in response to lipopolysaccharide and matrix degradation products.**

Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR.  
European Society of Cardiology – Heart Failure Congress, Goteborg, Mai 2011

**Biomarker determination for the prediction of heart failure following myocardial infarction.**

Serchi T, Haas B, Planchon S, Renaut J, Wagner DR, Bohn T, Devaux Y.

International meeting of the European Proteomic Association, Portugal, 2010

**Adenosine Down Regulates Toll-like Receptor 4 Activation.**

Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR.

American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, Novembre 2009

**Adenosine Interferes with Toll-like Receptor 4 Pathway Through Increased Binding of Beta-Arrestins to Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor-6.**

Haas B, Léonard F, Ernens I, Vausort M, Rolland-Turner M, Chan T, Feldman AM, Devaux Y, Wagner DR

European Society of Cardiology – Heart Failure Congress, Nice, Mai 2009

**Interference with Toll-like Receptor 4 Pathway Mediates the Anti-Inflammatory Effects of Adenosine.**

Haas B, Léonard F, Ernens I, Vausort M, Rolland-Turner M, Chan T, Feldman AM, Devaux Y, Wagner DR

Congrès annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Nancy, Avril 2009

# Liste des abréviations

<b>2D-DiGE</b>	2-Dimensional in-Gel Experiment
<b>ACP</b>	analyse en composantes principales
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>Ado</b>	adénosine
<b>ANOVA</b>	analyse de la variance
<b>AP-1</b>	protéine activatrice 1
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>AUC</b>	aire sous la courbe
<b>BCA</b>	acide bicinchoninique
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BNP</b>	Brain Natriuretic Peptide
<b>BSA</b>	albumine sérique bovine
<b>BVA</b>	analyse de la variation biologique
<b>CCR2</b>	récepteur aux chimiokines 2
<b>CD</b>	Cluster de Différenciation
<b>CGS21680</b>	2-[4-[(2- carboxyethyl)phenyl]ethylamino]-5'-N-ethylcarbamoyl
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
<b>CO<sub>2</sub></b>	dioxyde de carbone
<b>CPA</b>	N <sup>6</sup> -cyclopentyladenosine
<b>CPK</b>	créatine phosphokinase
<b>Cy</b>	cyanine
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phénylindole
<b>DIA</b>	analyse différentielle d'un gel
<b>DIP</b>	dipyridamole
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>DNase</b>	désoxyribonucléase
<b>dNTP</b>	désoxyribonucléotide
<b>DTT</b>	dithiothréitol

<b>ECG</b>	électrocardiogramme
<b>EDA</b>	analyse étendue des données
<b>EDTA</b>	acide éthylène-diamine-tétraacétique
<b>EGTA</b>	acide éthylène glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tétraacétique
<b>EHNA</b>	erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adénine
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>Fc</b>	fragment cristallisable
<b>FEVG</b>	fraction d'éjection du ventricule gauche
<b>FITC</b>	fluorescéine isothiocyanate
<b>fMLP</b>	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
<b>GAPDH</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>HA</b>	hyaluronan
<b>HCl</b>	acide chlorhydrique
<b>HMDB</b>	Human Metabolome DataBase
<b>Hp</b>	haptoglobine
<b>HRP</b>	peroxydase de raifort
<b>HS</b>	héparane sulfate
<b>HSA</b>	albumine sérique humaine
<b>hsCRP</b>	protéine C réactive haute sensibilité
<b>IB-MECA</b>	1- deoxy-1-[6-[[[3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purine-9-yl]-N- methyl-Dribofuranuronamide
<b>IC</b>	insuffisance cardiaque
<b>IEC</b>	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>IEF</b>	isoélectrofocalisation
<b>IFCC</b>	Fédération Internationale de Chimie Clinique et Médecine de Laboratoire
<b>IgG</b>	immunoglobulines G
<b>IL</b>	interleukine
<b>IM</b>	infarctus du myocarde
<b>INCCI</b>	Institut National de Chirurgie Cardiaque et Cardiologie Interventionnelle
<b>IPG</b>	gradient de pH immobilisé

<b>KCl</b>	chlorure de potassium
<b>LAL</b>	Lysat d'améboocytes de Limule
<b>LBP</b>	protéine de liaison au LPS
<b>LDH</b>	lactate déshydrogénase
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>LUCKY</b>	Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry
<b>MALDI</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
<b>M-CSF</b>	Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>MEC</b>	matrice extracellulaire de collagène
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	chlorure de magnésium
<b>miR</b>	micro-ARN
<b>MMP</b>	métalloprotéinase matricielle
<b>MOWSE</b>	Molecular Weight SEarch
<b>MS/MS</b>	spectrométrie de masse en tandem
<b>MTT</b>	bromure de tétrazolium 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl
<b>Myd</b>	Myeloid differentiation primary response gene
<b>NaCl</b>	chlorure de sodium
<b>NFκB</b>	facteur nucléaire kappa B
<b>NT-pro-BNP</b>	N-Terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>PBMC</b>	cellules mononucléaires du sang périphérique
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PE</b>	phycoérythrine
<b>Per-CP</b>	protéine peridinine-chlorophylle
<b>Pfu</b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>PMA</b>	phorbol 12-myristate 13-acétate
<b>PMSF</b>	fluorure de phénylméthylsulfonyl
<b>PRR</b>	Pattern-Recognition Receptor
<b>PVDF</b>	fluorure de polyvinylidène

<b>RECK</b>	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>RNase</b>	ribonucléase
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>ROC</b>	caractéristique de fonctionnement du récepteur
<b>ROS</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>RT-qPCR</b>	réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel
<b>SD</b>	déviatiion standard
<b>SDS</b>	dodécyl sulfate de sodium
<b>SDS-PAGE</b>	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<b>siARN</b>	petit acide ribonucléique interférant
<b>SMC</b>	cellule musculaire lisse
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SVF</b>	sérum de veau fœtal
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBST</b>	Tris-Buffered Saline-Tween
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TIMP</b>	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
<b>TIR</b>	récepteur Toll/IL-1
<b>TLR</b>	récepteur Toll-like
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TnT</b>	Troponine T
<b>TOF</b>	temps de vol
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

# **Table des illustrations**

<b>Figure 1</b> : représentation des différents types de maladies cardiovasculaires .....	36
<b>Figure 2</b> : représentation schématique d'une angioplastie coronaire avec pose d'un stent.....	41
<b>Figure 3</b> : mise en place du remodelage du ventricule gauche après infarctus du myocarde.....	48
<b>Figure 4</b> : déséquilibres entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque avec certains types cellulaires impliqués et les pathologies résultantes.....	50
<b>Figure 5</b> : régulation de la transcription des MMPs en réponse à différents stimuli ..	54
<b>Figure 6</b> : régulation de l'activité protéolytique des MMPs dans l'espace myocardique.....	55
<b>Figure 7</b> : signalisation intracellulaire des récepteurs de type Toll .....	60
<b>Figure 8</b> : système de reconnaissance du LPS .....	61
<b>Figure 9</b> : formule chimique de l'adénosine .....	64
<b>Figure 10</b> : voies de biosynthèse et de transport de l'adénosine endogène et exogène et principales enzymes impliquées.....	65
<b>Figure 11</b> : voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs à l'adénosine .....	67
<b>Figure 12</b> : représentation d'un électrocardiogramme normal.....	75
<b>Figure 13</b> : concept actuel pour la recherche de biomarqueurs incluant un lien entre étude du génome, du transcriptome, du protéome et du métabolome .....	81
<b>Figure 14</b> : focalisateur IPGphore III.....	116
<b>Figure 15</b> : appareil d'électrophorèse bidimensionnelle Ettan DALT II .....	117
<b>Figure 16</b> : Ettan Spot Handling Workstation et cible MALDI TOF .....	120
<b>Figure 17</b> : l'adénosine augmente l'expression de la MMP-9 au niveau ARNm et protéine chez le macrophage primaire issu de volontaires sains et de patients IM ...	124
<b>Figure 18</b> : l'adénosine augmente l'expression de la MMP-9 au niveau ARNm et protéine chez le macrophage THP-1 .....	126
<b>Figure 19</b> : les leucocytes extraits du sang de patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm MMP-9 que les leucocytes extraits de volontaires sains.....	127
<b>Figure 20</b> : l'adénosine induit une augmentation d'expression des ARNm A2B et A3 chez le macrophage THP-1 .....	129
<b>Figure 21</b> : l'activation du récepteur A3 stimule la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.....	130

<b>Figure 22</b> : l'inhibition sélective du récepteur A3 réduit la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez le macrophage THP-1 .....	131
<b>Figure 23</b> : l'adénosine augmente la synthèse de MMP-9 par les macrophages THP-1 activés .....	133
<b>Figure 24</b> : l'adénosine accroît l'expression de l'ARNm MD-2 chez le macrophage THP-1 .....	134
<b>Figure 25</b> : l'adénosine augmente l'expression de surface de CD14 chez le macrophage THP-1 activé.....	135
<b>Figure 26</b> : l'adénosine augmente la migration des monocytes vers un gradient de MCP-1.....	137
<b>Figure 27</b> : les ARNm du système de reconnaissance du LPS sont plus exprimés dans les cellules du sang total de patients souffrant d'un infarctus du myocarde par rapport aux volontaires sains .....	140
<b>Figure 28</b> : le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 est positivement corrélé avec le taux plasmatique de troponine T chez les patients IM.....	141
<b>Figure 29</b> : l'adénosine diminue l'expression de surface du récepteur TLR4 chez les macrophages primaires activés par le LPS .....	142
<b>Figure 30</b> : l'adénosine potentialise la diminution de l'expression de surface de TLR4 induite par le LPS chez les macrophages primaires activés .....	143
<b>Figure 31</b> : l'adénosine réduit l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1 activé .....	144
<b>Figure 32</b> : l'adénosine augmente l'expression des ARNm du système TLR4 chez les macrophages primaires activés .....	145
<b>Figure 33</b> : l'adénosine augmente l'expression de l'ARNm TLR4 chez le macrophage activé issu de patients IM.....	146
<b>Figure 34</b> : l'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage THP-1 .....	147
<b>Figure 35</b> : l'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage primaire .....	148
<b>Figure 36</b> : l'adénosine réduit la synthèse de TNF- $\alpha$ au niveau intracellulaire par les macrophages activés .....	149
<b>Figure 37</b> : l'adénosine réduit fortement l'accumulation de TNF- $\alpha$ induite par les ligands du TLR4 dans le milieu extracellulaire .....	150

<b>Figure 38</b> : l'adénosine réduit la synthèse de TNF- $\alpha$ par les macrophages issus de patients IM activés par le LPS .....	151
<b>Figure 39</b> : l'adénosine réduit la synthèse d'ARNm et de protéine TNF- $\alpha$ chez les macrophages primaires activés par le LPS .....	152
<b>Figure 40</b> : l'inhibition de l'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$ est plus importante lorsque l'adénosine est administrée en pré-traitement chez le macrophage primaire activé par le LPS .....	154
<b>Figure 41</b> : l'adénosine diminue l'expression de surface de TLR4 en quelques minutes chez le macrophage primaire.....	155
<b>Figure 42</b> : l'adénosine diminue rapidement l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1 .....	156
<b>Figure 43</b> : l'activation spécifique du récepteur A2A inhibe la production de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés.....	158
<b>Figure 44</b> : l'effet de l'adénosine sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés est supprimé par le blocage sélectif des récepteurs A2A/A2B	159
<b>Figure 45</b> : l'effet du NECA sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés est supprimé par de hautes concentrations d'antagonistes des récepteurs A2A/A2B.....	160
<b>Figure 46</b> : la déplétion de l'albumine et des immunoglobulines G augmente la résolution d'un gel 2D .....	163
<b>Figure 47</b> : l'analyse en composantes principales et la classification hiérarchique permettent de diviser les patients en 3 groupes .....	164
<b>Figure 48</b> : gels représentatifs du phénotype haptoglobine des patients souffrant d'un infarctus du myocarde.....	166
<b>Figure 49</b> : le niveau plasmatique d'haptoglobine est lié au groupe des patients souffrant d'un infarctus du myocarde .....	168
<b>Figure 50</b> : le phénotype haptoglobine des patients infarctus du myocarde est associé avec le score NYHA et le pronostic.....	169
<b>Figure 51</b> : modulation de la synthèse de MMP-9 par l'adénosine conditionnant la migration des monocytes dans le tissu cardiaque .....	174
<b>Figure 52</b> : effets de l'adénosine sur le système TLR4 chez le macrophage activé .	179
<b>Figure 53</b> : la valeur pronostique de l'haptoglobine dans l'insuffisance cardiaque dépend du phénotype exprimé .....	183

<b>Tableau 1 :</b> classification de l'insuffisance cardiaque basée sur la nature des symptômes à l'hospitalisation.....	43
<b>Tableau 2 :</b> classification fonctionnelle NYHA basée sur les symptômes observés en cas d'activité physique.....	45
<b>Tableau 3 :</b> classification structurale de l'American College of Cardiology et de la Société Européenne de Cardiologie.....	45
<b>Tableau 4 :</b> métalloprotéinases matricielles exprimées dans le cœur après infarctus du myocarde, substrats et cellules productrices.....	51
<b>Tableau 5 :</b> métalloprotéinases matricielles exprimées dans le cœur après infarctus du myocarde, phénotype obtenu après extinction ou surexpression.....	52
<b>Tableau 6 :</b> inhibiteurs tissulaires des MMPs et effets d'une extinction de leur expression.....	55
<b>Tableau 7 :</b> mécanismes de transduction, distribution tissulaire/cellulaire et fonction tissulaire/cellulaire des récepteurs à l'adénosine.....	68
<b>Tableau 8 :</b> agonistes et antagonistes des récepteurs à l'adénosine avec constante d'inhibition.....	69
<b>Tableau 9 :</b> exemples d'études cliniques réalisées à l'aide d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine.....	73
<b>Tableau 10 :</b> caractéristiques cliniques et démographiques des 12 patients souffrant d'infarctus du myocarde inclus dans l'étude TLR4.....	88
<b>Tableau 11 :</b> liste des siARNs utilisés pour les transfections transitoires sur cellules THP-1.....	92
<b>Tableau 12 :</b> caractéristiques des amorces employées en PCR quantitative.....	100
<b>Tableau 13 :</b> liste des anticorps et substrats employés en Western Blot.....	103
<b>Tableau 14 :</b> caractéristiques cliniques et démographiques des 30 patients souffrant d'infarctus du myocarde inclus dans l'étude protéomique.....	111

# **Table des Matières**

<b>Remerciements .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des travaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>10</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>15</b>
<b>Table des Matières .....</b>	<b>20</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>28</b>
<b>Étude bibliographique .....</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 1 : biologie et pathologies du cœur .....</b>	<b>35</b>
1°) Pathologies cardiovasculaires – épidémiologie et étiologie .....	35
2°) Cardiopathies coronariennes - athérosclérose.....	37
3°) L’infarctus du myocarde .....	37
3.1°) Structure et histologie du cœur .....	37
3.2°) L’ischémie myocardique.....	38
3.3°) L’infarctus du myocarde .....	39
3.4°) La reperfusion – stratégie thérapeutique.....	40
4°) L’insuffisance cardiaque .....	42
4.1°) Les différents types d’insuffisance cardiaque.....	43
4.2°) Dysfonction systolique versus diastolique.....	43
4.3°) Diagnostic et traitements.....	44
<b>Chapitre 2 : remodelage myocardique.....</b>	<b>47</b>
1°) Remodelage myocardique.....	47
1.1°) Mécanismes fondamentaux.....	47
1.2°) Matrice extracellulaire cardiaque.....	49
1.3°) Les métalloprotéinases matricielles .....	50
1.3.1°) Structure et fonction.....	51
1.3.2°) Synthèse, activation et régulation .....	52

1.4°) La MMP- 9 et TIMP-1 .....	56
2°) Inflammation .....	57
2.1°) Cytokines, chimiokines, stress oxydant .....	58
2.2°) Activation du complément .....	59
2.3°) Les récepteurs de l'immunité innée de type Toll .....	59
2.4°) Le récepteur Toll-like 4 .....	61
3°) Tissu de granulation, formation de la cicatrice, remodelage tardif .....	63
<b>Chapitre 3 : propriétés cardioprotectrices et anti-inflammatoires de l'adénosine .....</b>	<b>64</b>
1°) L'adénosine .....	64
1.1°) Structure et localisation .....	64
1.2°) Biosynthèse, concentrations physiologique et pathologique .....	65
2°) Récepteurs à l'adénosine .....	66
2.1°) Structure et voies d'activation .....	66
2.2°) Ligands .....	68
3°) Potentiel thérapeutique .....	69
3.1°) Effets sur la fonction cardiaque .....	69
3.2°) Essais cliniques .....	71
<b>Chapitre 4 : recherche de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires .....</b>	<b>74</b>
1°) Diagnostic de l'infarctus du myocarde .....	74
1.1°) L'électrocardiographie .....	74
1.2°) Troponines cardiaques .....	76
1.3°) Créatine phosphokinase .....	76
2°) Biomarqueurs pronostiques de l'insuffisance cardiaque .....	77
2.1°) Biomarqueurs de l'inflammation .....	77
2.2°) Biomarqueurs du stress oxydant .....	77
2.3°) Biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque ...	78
2.4°) Biomarqueurs neurohormonaux .....	78
2.5°) Biomarqueurs des dommages myocardiques .....	79
2.6°) Biomarqueurs du stress myocardique .....	79
2.7°) Bilan .....	81

3°) Nouvelles stratégies pour l'identification de biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque .....	81
3.1°) Génomique et transcriptomique .....	82
3.2°) Protéomique et métabolomique .....	83
<b><i>Matériel et Méthodes.....</i></b>	<b>86</b>
<b>Chapitre 1: effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 et sur l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage.....</b>	<b>87</b>
1°) Le registre LUCKY et les patients inclus dans l'étude TLR4 .....	87
2°) Culture cellulaire.....	89
2.1°) Culture de la lignée monocytoïde THP-1 .....	90
2.1.1°) Mise en culture.....	90
2.1.2°) Traitements.....	91
2.1.2.1°) Etude MMP-9 – traitements, transfections, évaluation de la capacité migratoire.....	91
2.1.2.2°) Etude TLR4 - traitements.....	93
2.2°) Culture de macrophages primaires humains .....	93
2.2.1°) Isolement des monocytes primaires .....	93
2.2.1.1°) Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique ..	93
2.2.1.2°) Purification des monocytes par sélection négative .....	94
2.2.2°) Obtention de macrophages primaires à partir des monocytes isolés	95
2.2.3°) Traitements des macrophages primaires .....	95
2.2.3.1°) Cas de l'étude MMP-9 .....	95
2.2.3.2°) Cas de l'étude TLR4 .....	95
3°) Etude de l'expression des ARNm .....	96
3.1°) Préparation des ARN totaux .....	96
3.1.1°) à partir de sang total .....	96
3.1.2°) à partir de cellules en culture .....	97
3.2°) Rétrotranscription des ARN totaux.....	98
3.3°) Choix des amorces pour la PCR quantitative en temps réel .....	98
3.4°) PCR quantitative en temps réel.....	99
4°) Etude de l'expression des protéines d'intérêt .....	101
4.1°) Western blotting.....	101

4.1.1°) Traitements des échantillons.....	101
4.1.2°) SDS-PAGE.....	101
4.1.3°) Electro-transfert sur membrane et révélation.....	102
4.1.4°) Analyse densitométrique.....	103
4.2°) Analyse de l'activité gélatinase de la MMP-9 : zymographie .....	103
4.2.1°) Principe de la technique .....	103
4.2.2°) Mode opératoire .....	104
4.3°) Dosage immunoenzymatique de MMP-9 et TNF- $\alpha$ .....	105
5°) Cytométrie en flux .....	105
5.1°) Marquage extracellulaire.....	106
5.1.1°) Etude MMP-9.....	106
5.1.2°) Etude TLR4.....	106
5.2°) Marquage intracellulaire .....	107
6°) Immunofluorescence .....	108
7°) Analyse statistique .....	109

## **Chapitre 2 : recherche de biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde par analyse protéomique de protéines plasmatiques 110**

1°) Pré-requis pour la mise en place d'une étude protéomique .....	110
2°) Le registre LUCKY et la sélection des patients pour l'étude protéomique .	110
3°) Prélèvement du plasma pour l'étude protéomique et déplétion des protéines hautement exprimées .....	112
4°) Analyse protéomique par 2D-DiGE.....	113
4.1°) Principe de la technique .....	113
4.2°) Traitement des plasmas déplétés et marquage fluorescent .....	114
4.3°) Electrophorèse bidimensionnelle .....	115
4.3.1°) Première dimension – isoélectrofocalisation .....	115
4.3.2°) Deuxième dimension – SDS-PAGE .....	116
4.4°) Scan des gels et analyse différentielle.....	118
5°) Digestion tryptique et spectrométrie de masse .....	119
6°) Mesure des marqueurs biochimiques.....	121
6.1°) Chimie et immunochimie clinique.....	121
6.2°) Dosage immuno-enzymatique de MMP-9 et TIMP-1 .....	121

7°) Analyse statistique .....	122
<b>Résultats .....</b>	<b>123</b>
<b>Chapitre 1 : l'activation du récepteur à l'adénosine A3 stimule la sécrétion de MMP-9 par les macrophages .....</b>	<b>124</b>
1°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages....	124
1.1°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains .....	124
1.2°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages issus de la lignée THP-1 .....	125
1.3°) Expression de la MMP-9 par les cellules du sang total .....	127
2°) Implication des récepteurs à l'adénosine dans la production accrue de MMP-9 par les macrophages .....	128
2.1°) Expression des récepteurs à l'adénosine .....	129
2.2°) Effet d'agonistes des récepteurs à l'adénosine .....	130
2.3°) Effet d'une inhibition des récepteurs à l'adénosine .....	131
2.4°) Conclusion .....	132
3°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages activés .....	132
4°) Effets sur les composants du système de reconnaissance du LPS .....	134
5°) Effets de l'adénosine sur la migration des monocytes .....	136
<b>Chapitre 2 : l'adénosine réduit l'expression de surface du récepteur TLR4 et l'inflammation en réponse au lipopolysaccharide et aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque.....</b>	<b>139</b>
1°) Effets de l'adénosine sur la voie du récepteur TLR4.....	139
1.1°) Expression des éléments de reconnaissance du LPS par les cellules du sang total .....	139
1.2°) Effets de l'adénosine sur l'expression de TLR4 par les macrophages .	141
1.2.1°) Expression de surface.....	142
1.2.2°) Expression des ARNm du système TLR4.....	144
1.2.3°) Expression de la protéine TLR4.....	146

1.3°) Conclusion .....	148
2°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de cytokines pro- inflammatoires par les macrophages activés .....	149
2.1°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ .....	149
2.2°) Conclusion .....	151
3°) Etude mécanistique des effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés .....	152
3.1°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ - cinétique .....	152
3.2°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ - séquence .....	153
3.3°) Expression de surface de TLR4 .....	155
3.4°) Conclusion .....	157
4°) Implication des récepteurs à l'adénosine dans la diminution de synthèse de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés .....	157
4.1°) Effets d'agonistes des récepteurs à l'adénosine .....	157
4.2°) Effets d'antagonistes .....	159
4.2.1°) Avec traitement adénosine .....	159
4.2.2°) Avec traitement NECA .....	160
4.3°) Conclusion .....	161

**Chapitre 3 : identification de l'haptoglobine comme biomarqueur potentiel de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde par analyse du protéome plasmatique..... 162**

1°) Recherche de biomarqueur de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde par analyse protéomique .....	162
2°) Cohorte test : données cliniques et suivi médical .....	162
3°) Identification d'un biomarqueur par analyse protéomique .....	163
3.1°) Pré-traitement des plasmas.....	163
3.2°) Analyse protéomique par 2D-DIGE .....	164
4°) Corrélation avec l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde .....	167
4.1°) Isoformes d'haptoglobine et taux plasmatiques.....	167
4.2°) Association entre l'haptoglobine et le pronostic médical .....	168
4.3°) Conclusion .....	170

<i>Discussion</i> .....	171
<i>Conclusion et perspectives</i> .....	185
<i>Bibliographie</i> .....	187
<i>Annexes</i> .....	201

# Introduction

Dans les pays développés, les maladies cardiovasculaires représentent une cause majeure de morbidité et de mortalité. Leur prévalence et leur coût en terme de santé publique vont augmenter de façon exponentielle dans les 20 années à venir <sup>1</sup>. L'insuffisance cardiaque (IC) consécutive à un infarctus du myocarde (IM) représente à l'heure actuelle la maladie cardiovasculaire avec la plus forte progression dans nos contrées, atteignant des proportions épidémiques (3% de la population adulte), avec un taux de mortalité avoisinant les 70% à 5 ans <sup>2-5</sup>.

L'IM correspond à l'occlusion d'une artère coronaire, ce qui crée un évènement ischémique. L'ischémie réduit l'apport en oxygène et nutriments des cellules cardiaques, ce qui les endommage. C'est le premier pas vers le développement d'une IC. Après l'incident ischémique, le muscle cardiaque endommagé entre dans le processus de remodelage, notamment au niveau du ventricule gauche. Ce remodelage est dit adaptatif car il conduit normalement à une restauration de la fonction cardiaque, mais dans certains cas, il peut devenir délétère (maladaptatif) et conduire à l'IC. Plusieurs mécanismes sont responsables de la transition remodelage adaptatif *versus* maladaptatif.

Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer la dérégulation de l'activation de la réponse pro-inflammatoire. Cette réponse pro-inflammatoire fait appel à de nombreux médiateurs cellulaires et non cellulaires, notamment les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les récepteurs de type Pattern-Recognition Receptor (PRRs), modulateurs de l'immunité innée reconnaissant des motifs moléculaires conservés (récepteur de type Toll notamment).

L'enzyme MMP-9 est impliquée dans le développement et la progression du remodelage maladaptatif, notamment par un déséquilibre physiologique entre la quantité de MMP-9 et la quantité de son inhibiteur tissulaire TIMP-1. Ce déséquilibre conduit à une dégradation massive de la matrice extracellulaire cardiaque (MEC). Le bénéfice clinique d'une inhibition des MMPs a fait et fait encore l'objet de nombreuses études (études cliniques PREMIER et MIDAS par exemple) mais n'a, à l'heure actuelle, pas été établi <sup>6-8</sup>. Les mécanismes responsables de l'activation de la MMP-9 consécutive à un IM ne sont que partiellement caractérisés et en tenant compte de la complexité de la régulation de la MEC, la modulation de la MMP-9 et/ou de ces activateurs potentiels présente un intérêt thérapeutique.

Le récepteur Toll-like 4 (TLR4) est impliqué dans l'induction et la régulation de la réponse inflammatoire consécutivement à un IM et son expression est augmentée dans le cœur en état d'insuffisance cardiaque <sup>9</sup>. De plus, l'inactivation génétique (knockdown) du TLR4 réduit de façon significative la progression du remodelage du ventricule gauche, préserve la fonction systolique mais n'affecte pas la taille de l'infarctus chez la souris <sup>10</sup>. Les souris n'exprimant pas TLR4 présentent une fibrose interstitielle et une hypertrophie myocardique réduites dans la zone non infarctée <sup>10</sup>. La concentration de collagène est plus élevée dans la zone infarctée comparé aux souris du groupe contrôle <sup>10</sup>. Les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) sont réduites, ainsi que les concentrations de MMP-2 et MMP-9 <sup>10</sup>. Le ligand principal du TLR4 est le lipopolysaccharide bactérien (LPS), qui n'est spontanément pas présent dans le cœur. Cependant, il a été démontré que des composants de rupture de la MEC tels que le hyaluronan (HA) ou l'héparane sulfate (HS) ont la capacité de se lier à TLR4 et d'activer l'inflammation <sup>11</sup>. Ces constatations font de TLR4 une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'inflammation et du remodelage maladaptatif post-IM.

Le nucléoside adénosine (Ado) est formé suite à la déphosphorylation de l'adénosine triphosphate (ATP) en conditions d'ischémie <sup>12</sup>. Une fois présente dans le milieu extracellulaire, elle peut interagir avec ses 4 récepteurs cellulaires : A1, A2A, A2B et A3 <sup>13</sup>. Des études ont montré que la production d'adénosine est accrue lors d'une hypoxie, d'une ischémie, d'un stress ou encore d'une inflammation provoquant une atténuation de ces conditions pathologiques, ce qui suggère un effet anti-inflammatoire et cardioprotecteur de l'adénosine <sup>13-15</sup>.

Des études menées dans notre laboratoire ont montré que l'adénosine diminue la libération de MMP-9 par les polynucléaires neutrophiles humains activés *via* le récepteur A2A <sup>16</sup>, suggérant ainsi une diminution potentielle du remodelage matriciel dans la phase précoce de l'infarctus. L'adénosine diminue également la synthèse de TNF- $\alpha$  et d'interleukine-6 (IL-6) chez les myocytes cardiaques <sup>17-19</sup>, atténuant ainsi la réponse inflammatoire. De plus, l'adénosine est capable de promouvoir la restauration de la fonction cardiaque par une stimulation pro-angiogénique médiée par le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) produit par les macrophages <sup>20</sup>.

Les monocytes/macrophages représentent la seconde vague cellulaire recrutée au niveau de la zone infarctée, après les polynucléaires neutrophiles. L'infiltration tissulaire des monocytes et leur différenciation en macrophages est conditionnée par un chimiotactisme le long d'un gradient de Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). La MCP-1 se lie au récepteur CCR-2 (Chemokine Receptor-2) présent à la surface des monocytes. Les macrophages sont des contributeurs principaux de la synthèse de MMP-9 après l'IM et les principaux modulateurs/acteurs de l'inflammation.

Le pronostic d'un IM a été considérablement amélioré avec les progrès des techniques de reperfusion. Cependant, 60% des patients atteints d'un IM développent une IC dans les 6 ans après IM<sup>2, 21</sup>. L'identification rapide de ces patients et l'amélioration de leur prise en charge permettraient de réduire l'impact de l'IC, étant donné que cette pathologie peut potentiellement être prévenue. À l'heure actuelle, le pronostic d'une IC est toujours difficile à établir avec précision et la découverte de nouveaux biomarqueurs pouvant être ajoutés au panel existant serait profitable.

Le développement de l'IC est principalement induit par le remodelage du ventricule gauche. Ce remodelage est associé à une dérégulation de la réponse inflammatoire, de l'angiogénèse et du renouvellement de la MEC. Ces mécanismes sont régulés par une grande quantité de médiateurs. La MMP-9, entre autres, constitue un indicateur pronostic du développement d'une IC post-IM<sup>22-25</sup>. Son expression et son activité sont élevées chez les patients insuffisants cardiaques<sup>26, 27</sup>, et son inhibition réduit l'hypertrophie ventriculaire chez l'animal ayant subi un infarctus du myocarde<sup>28</sup>.

Les approches classiques de biologie moléculaire visant à étudier et caractériser une seule cible thérapeutique semblent limitées lorsqu'il s'agit d'étudier une pathologie complexe et multifactorielle comme l'IC. Les avancées technologiques des 30 dernières années dans l'analyse à haut débit d'un système biologique (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) permettent aujourd'hui de cribler, identifier et caractériser des biomarqueurs potentiels d'une pathologie. L'équipe du laboratoire a identifié récemment un ensemble de biomarqueurs potentiels de la dysfonction ventriculaire et de l'IC en combinant des données transcriptomiques et interactomiques<sup>29</sup>, à l'aide d'outils de la bioinformatique.

Cette approche de biologie des systèmes consiste à intégrer plusieurs niveaux d'informations. L'équipe du laboratoire a ainsi pu mettre en évidence des réseaux de gènes impliqués dans le développement d'une IC post IM<sup>30</sup>, ainsi que des réseaux d'interactions protéine-protéine différenciellement influencés par le développement d'une IC<sup>31</sup>. L'étude de la régulation de voies biologiques essentielles lors de la dysfonction ventriculaire a également suggéré l'implication de la voie de la biosynthèse de la leucine et de l'activation antigène-dépendante des lymphocytes B<sup>32</sup>. Deux autres études menées par le laboratoire ont identifié 3 gènes reliés à l'inflammation<sup>33</sup>, ainsi que 3 gènes reliés à l'angiogénèse<sup>34</sup> comme étant des prédicteurs possibles du pronostic post-IM.

#### Hypothèses de travail :

Nous émettons l'hypothèse que l'adénosine est capable de moduler le remodelage du ventricule gauche en agissant d'une part sur la production de MMP-9, et d'autre part sur la voie du TLR4.

Nous émettons également l'hypothèse que l'analyse du protéome plasmatique de patients souffrant d'un IM permet l'identification de biomarqueurs pronostiques de l'IC.

#### Objectifs de ce travail :

Le premier objectif de ce travail a été d'élucider certains des effets cardioprotecteurs et anti-inflammatoires de l'adénosine, toujours mal caractérisés à cause de la distribution tissulaire et des spécificités de chacun de ses récepteurs<sup>35</sup>. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages et sur l'expression du TLR4.

Le second objectif de ce travail a été d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques de l'insuffisance cardiaque post-IM. Nous avons pour cela effectué une analyse protéomique du plasma issu de patients souffrant d'un IM.

### Organisation du manuscrit

Ce mémoire comprend 5 parties. La première partie présente une synthèse de la bibliographie existante, axée sur la physiopathologie du remodelage ventriculaire post IM, les propriétés cardioprotectrices de l'adénosine, et la recherche de nouveaux biomarqueurs. La seconde partie détaille les protocoles expérimentaux employés dans la réalisation de ce travail. La troisième partie présente les résultats obtenus. Ces résultats sont ensuite discutés dans une quatrième partie. La dernière partie est consacrée aux conclusions et perspectives.

### Considérations pratiques

La majeure partie des expériences présentées a été réalisée au Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire du Centre de Recherche Public en Santé à Luxembourg. Les expériences de protéomique ont été effectuées à la plate-forme de protéomique du Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann à Belvaux, Luxembourg.

Ce travail a été co-financé par une bourse d'Aide à la Formation-Recherche (AFR) attribuée pour 3 ans par le Fonds National de la Recherche (FNR) de Luxembourg, et par le ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg.

### Contribution

Ma contribution à l'étude MMP-9 a essentiellement porté sur l'étude de la sécrétion de MMP-9 par les macrophages, ainsi que des effets de l'inhibition des récepteurs à l'adénosine sur cette sécrétion.

Ma contribution à l'étude TLR4 a porté sur l'étude de l'expression de surface de TLR4 par cytométrie en flux, ainsi que sur la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et la caractérisation des récepteurs à l'adénosine impliqués dans cet effet.

Ma contribution à l'étude protéomique a porté sur la mise en place de la collecte ainsi que la mise au point des traitements des plasmas afin qu'ils soient utilisables pour les expériences de protéomique. J'ai pu également bénéficier d'une formation à la technique de 2D-DiGE dispensée par la plate-forme de protéomique du Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, qui m'a permis de mettre au point les conditions d'électrophorèse bidimensionnelle.

# Étude bibliographique

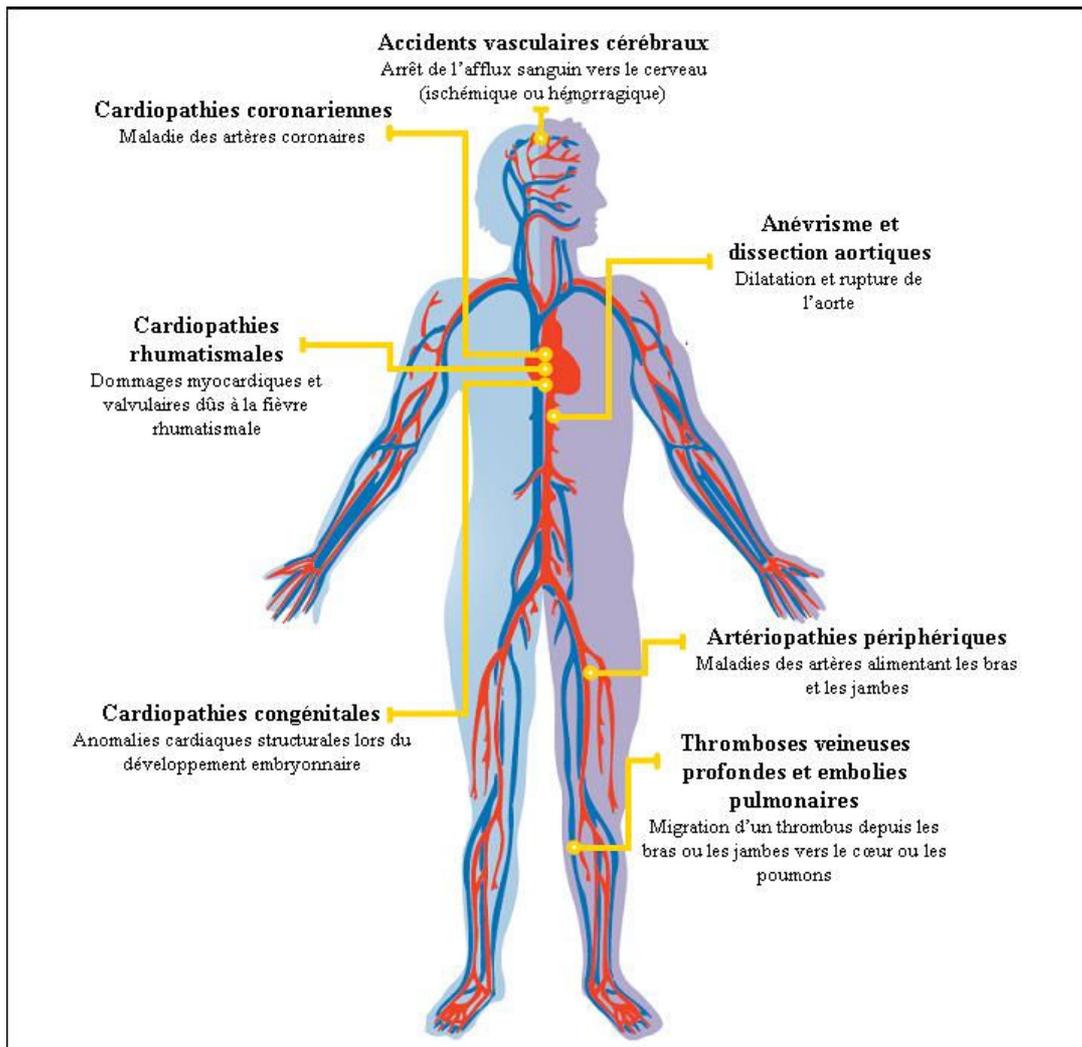
## Chapitre 1 : biologie et pathologies du cœur

### 1°) Pathologies cardiovasculaires – épidémiologie et étiologie

Les dernières évaluations publiées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en juin 2011 indiquent que pour l'année 2008, 57 millions de personnes sont décédées dans le monde. Parmi elles, 17 millions ont péri des suites de maladies cardiovasculaires (soit 29% de la mortalité mondiale). L'OMS estime que d'ici 2030, plus de 23 millions de personnes mourront d'une maladie cardiovasculaire.

Plus de 80% des décès imputés aux maladies cardiovasculaires ont lieu dans des pays en développement à faible ou moyen revenu. Les maladies cardiovasculaires représentent à l'heure actuelle la cause majeure de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés <sup>1</sup>.

Sous la dénomination « maladies cardiovasculaires » sont regroupées les pathologies suivantes : cardiopathies coronariennes, cardiopathies rhumatismales, cardiopathies congénitales, accidents vasculaires cérébraux, rupture d'anévrisme et dissection aortique, artériopathies périphériques, thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires. La **Figure 1** présente un schéma récapitulatif des différentes maladies cardiovasculaires.



**Figure 1 :** représentation des différents types de maladies cardiovasculaires (d'après Mackay et Mensah, Atlas of Heart Disease and Stroke, distribué par l'Organisation Mondiale de la Santé <sup>36</sup>)

Le développement des maladies cardiovasculaires est influencé par différents facteurs de risque. En premier lieu interviennent les facteurs de risque majeurs et modifiables <sup>36</sup>: hypertension artérielle <sup>37</sup>, hyperlipidémie (cholestérol et triglycérides), consommation d'alcool <sup>38</sup> et de tabac <sup>39</sup>, inactivité physique, obésité <sup>40, 41</sup>, mauvaises habitudes alimentaires, diabète <sup>42</sup>. D'autres facteurs de risque mineurs et modifiables peuvent intervenir également <sup>36</sup>: statut social, état psychologique, consommation de certains médicaments (hormonothérapie et contraception). En dernier lieu, il existe les facteurs de risques non modifiables <sup>36</sup>: âge <sup>15, 21</sup>, hérédité et/ou historique médical familial <sup>43, 44</sup>, sexe <sup>45, 46</sup>, ethnicité.

## **2°) Cardiopathies coronariennes - athérosclérose**

Parmi les pathologies cardiovasculaires, les cardiopathies coronariennes représentent plus de la moitié des cas recensés et provoquent la moitié des décès enregistrés. De plus, l'implication d'un ou plusieurs facteurs de risques majeurs est corrélée au développement d'une cardiopathie coronarienne <sup>47</sup>. Une cardiopathie coronarienne correspond à un rétrécissement des artères coronaires, aboutissant à une ischémie myocardique. L'ischémie myocardique peut être de courte durée et réversible, on parle alors d'angor (ou angine de poitrine), ou prolongée et dans ce cas, elle aboutit à un infarctus du myocarde (IM).

Le rétrécissement d'une artère est principalement dû à la formation d'une plaque d'athérome, structure composée de lipides, cholestérol, dépôts calciques, produits sanguins, etc. Le terme employé pour désigner cette pathologie est athérosclérose. Ce phénomène est majoritairement dû au vieillissement progressif des artères et à la perte de leur élasticité. La ou les plaques d'athérome sont recouvertes au fur et à mesure par des plaquettes, du fibrinogène, des dépôts calciques et obstruent progressivement l'artère ; la rupture d'une plaque d'athérome aboutit à un thrombus et à l'apparition d'une ischémie, le plus fréquemment un IM <sup>48</sup>. L'étude INTERHEART publiée en 2004, indique que les facteurs de risques majeurs modifiables sont à l'origine de l'apparition d'un IM dans plus de 90% des cas, sexe et âge confondus <sup>49</sup>.

## **3°) L'infarctus du myocarde**

### **3.1°) Structure et histologie du cœur**

Le cœur est l'organe vital assurant la circulation du sang dans tout le corps grâce à des contractions régulières permettant ainsi l'oxygénation, la distribution des nutriments et l'élimination des déchets de l'organisme. Le cœur est composé de 4 cavités : 2 *atria* ou oreillettes, une droite et une gauche, et deux ventricules, un droit et un gauche. Les parties gauche et droite du cœur sont séparées par une épaisse barrière, le septum atrio-ventriculaire. L'oreillette gauche reçoit le sang oxygéné venant des poumons et l'envoie vers le ventricule gauche. Celui-ci expulse le sang oxygéné *via* l'artère aorte vers tous les tissus et organes. Le sang, alors appauvri en oxygène par

les tissus et organes, est drainé par les veines et rejoint l'oreillette droite pour être expulsé vers le ventricule droit qui l'envoie dans la circulation pulmonaire où il sera rechargé en oxygène, et ainsi de suite. Le cœur est également un organe asymétrique, le ventricule gauche est beaucoup plus développé que le ventricule droit afin d'assurer sa fonction de pompage à travers l'organisme. L'irrigation sanguine des tissus cardiaques, et plus particulièrement du myocarde, est assurée par les artères coronaires, présentes à la surface du cœur et impliquées dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

Les battements cardiaques suivent une séquence particulière appelée révolution cardiaque, divisée en 3 phases : la systole auriculaire (durant laquelle les oreillettes se remplissent puis se contractent activement pour envoyer le sang dans les ventricules), la systole ventriculaire (durant laquelle ce sont les ventricules qui se contractent et éjectent le sang vers le système circulatoire) et la diastole (durant laquelle les cavités cardiaques se relaxent et se remplissent de façon passive).

Du point de vue histologique, le cœur est composé de 4 tissus : le péricarde, l'épicarde, le myocarde et l'endocarde. Le péricarde est un tissu conjonctif (majoritairement des fibroblastes) entourant le cœur et dont la structure est en feuillets : le feuillet fibreux à l'extérieur puis le feuillet pariétal et le feuillet viscéral. Ces deux derniers feuillets sont séparés par un espace dit péricardique rempli de liquide interstitiel (permettant les mouvements cardiaques). L'épicarde est également un tissu conjonctif entourant le muscle cardiaque, considéré comme un élément du péricarde viscéral. Le tissu suivant est le myocarde, tissu musculaire composé par les cellules musculaires cardiaques (cardiomyocytes pour environ 70% du volume cardiaque) et par des cellules non myocytaires (parmi elles 90 à 95% de fibroblastes)<sup>50</sup>. Le dernier tissu est l'endocarde qui tapisse la face interne des quatre cavités cardiaques, c'est un endothélium qui recouvre la face interne du myocarde.

### **3.2°) L'ischémie myocardique**

L'ischémie est définie comme étant une diminution/un arrêt de l'apport en sang artériel à un organe. Elle est à l'origine d'une baisse de l'oxygénation des tissus (hypoxie) entraînant la perturbation, voire l'arrêt de la fonction de l'organe.

L'ischémie peut avoir différentes origines. Elle peut être due à un thrombus qui obstrue une artère, une plaque d'athérome ou à la rupture d'une plaque d'athérome. Elle peut également être provoquée par une hémorragie, une compression d'une artère par un objet extérieur (écrasement d'un membre) ou un phénomène interne (hématome, tumeur) qui empêche les tissus d'être correctement alimentés en sang. L'ischémie peut être réversible (angor) et n'entraîner qu'une gêne limitée mais elle peut également être irréversible et conduire à l'infarctus de l'organe, c'est-à-dire à la nécrose brutale d'une partie ou de la totalité de celui-ci.

L'ischémie myocardique concerne exclusivement les artères coronaires et est principalement la conséquence de l'athérosclérose. Elle affecte le myocarde, tissu majoritaire du cœur. C'est un muscle strié dont la composition cellulaire inclut des cardiomyocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. La cohésion de ce tissu est assurée par la présence d'une matrice extracellulaire (MEC), dont le maintien est assuré par différentes molécules<sup>50</sup>.

Les cardiomyocytes assurent la contractilité du cœur par leurs battements réguliers. Ce sont des cellules hautement consommatrices d'énergie, principalement par l'utilisation d'adénosine triphosphate (ATP). La synthèse d'ATP est majoritairement réalisée grâce à un apport régulier en oxygène. Un défaut d'approvisionnement en oxygène détourne les voies de synthèse d'ATP aérobie vers la voie de la glycolyse anaérobie. Les cellules épuisent donc rapidement leurs réserves d'ATP et le déficit de contraction et de métabolisme s'installe par modification des protéines contractiles (tubuline, troponine, myosine, tropomyosine, etc.), par des dommages mitochondriaux et par une baisse des activités enzymatiques métaboliques essentielles<sup>51,52</sup>. La prolongation de cette privation d'oxygène aboutit à la nécrose des cardiomyocytes et autres cellules myocardiques, appelée infarctus du myocarde.

### **3.3°) L'infarctus du myocarde**

L'infarctus du myocarde se manifeste par la nécrose massive et rapide des cellules qui composent le myocarde (principalement les cardiomyocytes). Il est la conséquence d'une occlusion artérielle coronaire entraînant une ischémie : les cellules du myocarde n'étant plus suffisamment alimentées en oxygène meurent et la fonction contractile du cœur est atteinte.

Dans un premier temps, une réponse de type inflammatoire va être mise en place par l'organisme au niveau de la zone infarctée, pour traiter la nécrose cellulaire. Elle fait appel à l'activation du complément et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui permet l'activation ultérieure d'une cascade de cytokines pro-inflammatoires (interleukines IL et tumor necrosis factor- $\alpha$  TNF- $\alpha$  entre autres) qui joueront un rôle lors du retour du sang au niveau de la lésion (reperfusion) <sup>52-55</sup>. Cette inflammation est nécessaire à l'établissement d'un tissu cicatriciel et au processus de guérison. Dans un second temps, le cœur doit pallier le déficit contractile, il se dilate afin de s'adapter aux nouvelles conditions hémodynamiques <sup>56</sup>. Pour que cette dilatation soit stable et fonctionnelle, la structure même du muscle se modifie, en particulier sa composante matricielle : un processus appelé remodelage ventriculaire myocardique <sup>57</sup>. Ce processus est essentiellement concentré au niveau du ventricule gauche qui propulse le sang chargé en oxygène dans le reste du corps. Un équilibre approprié entre synthèse et dégradation de la matrice est nécessaire pour une morphogénèse normale et le maintien du tissu cicatriciel, ce qui fait du remodelage un mécanisme adaptatif souhaitable <sup>58</sup>. En revanche, si ce processus s'amplifie ou se dérégule, le remodelage est dit maladaptatif : il devient alors pathologique et peut engendrer un défaut de contraction et/ou un mauvais remplissage des cavités cardiaques conduisant à l'apparition d'une insuffisance cardiaque <sup>57, 58</sup>.

L'inflammation et le remodelage du ventricule gauche seront abordés au niveau cellulaire et moléculaire dans la seconde partie de cette étude bibliographique.

### **3.4°) La reperfusion – stratégie thérapeutique**

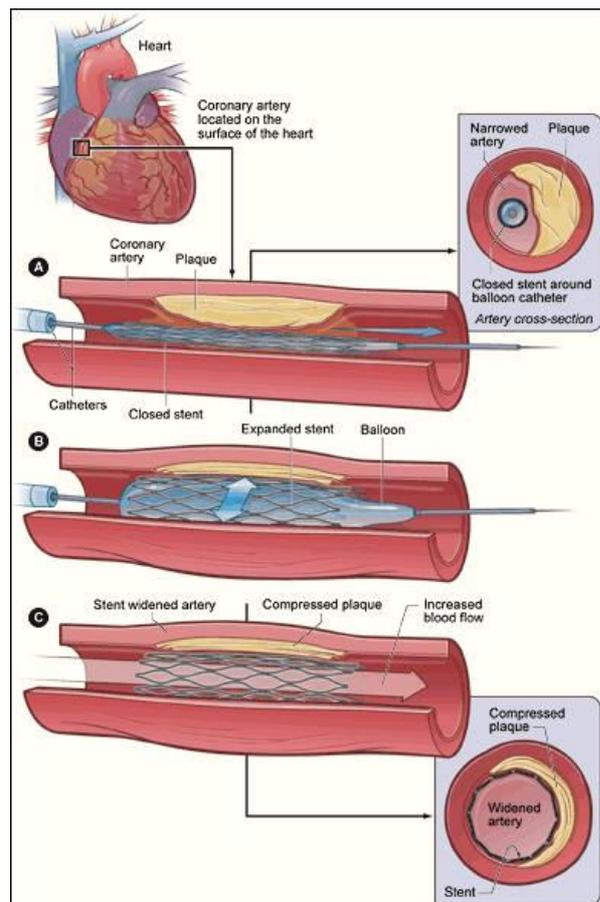
Lorsqu'un infarctus du myocarde est diagnostiqué, la stratégie thérapeutique consiste à stabiliser la progression de la lésion en limitant la nécrose au maximum. Cette stratégie est appelée reperfusion cardiaque.

Les thérapies de reperfusion sont le premier traitement de l'infarctus du myocarde <sup>59, 60</sup>. Les 3 types de reperfusion sont : traitement thrombolytique, angioplastie coronaire et pontage aorto-coronarien. Ils sont avant tout dépendants du temps de prise en charge du patient.

Les traitements thrombolytiques sont administrés moins de 12 heures après IM, avec une efficacité accrue à moins de 4 heures, à condition que le patient présente

certaines caractéristiques, comme une élévation significative du segment ST à l'électrocardiogramme <sup>61-63</sup>.

L'angioplastie coronarienne <sup>64</sup> est une micro-chirurgie peu invasive réalisée afin d'écraser le thrombus à l'aide d'un ballon introduit *via* une artère périphérique (fémorale ou brachiale par exemple). Le ballon sert également dans de nombreux cas au déploiement d'un stent, sorte de petit ressort permettant de maintenir la dilatation artérielle provoquée par le ballon et empêcher le phénomène de resténose (réocclusion de l'artère coronaire post-opération). La circulation sanguine est alors rétablie (**Figure 2**). De plus, afin de prévenir la formation d'un nouveau thrombus dû au stent lui-même, les chirurgiens peuvent utiliser, selon l'état de santé du patient, des stents dits « actifs », contenant un produit à effet anti-aggrégant plaquettaire. L'angioplastie coronarienne est la technique de reperfusion la plus employée à l'unité de chirurgie interventionnelle du Centre Hospitalier de Luxembourg.



**Figure 2 :** représentation schématique d'une angioplastie coronaire avec pose d'un stent (source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Stent>)

*A Le cathéter contenant le ballon et le stent fermé est introduit dans l'artère coronaire au niveau de la plaque occlusive. B Le ballon est ensuite gonflé, le stent se déploie et la plaque est comprimée, ce qui restaure la circulation sanguine. C Le cathéter est ensuite retiré, le stent déployé reste en place et maintient la compression de la plaque.*

La dernière technique de reperfusion est le pontage aorto-coronarien, c'est une chirurgie lourde, qui consiste à implanter une dérivation sanguine afin de contourner l'artère sténosée. Cette dernière technique est plus souvent employée lorsque le patient présente plusieurs artères affectées, elle est plus invasive que l'angioplastie coronarienne mais présente moins de risques de réintervention <sup>65</sup>. Elle n'est jamais réalisée dans la phase aiguë de l'infarctus.

#### **4°) L'insuffisance cardiaque**

Au Luxembourg, l'Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle (INCCI) a recensé 1573 patients atteints de pathologies cardiovasculaires et décédés en 2003. Parmi ceux-ci, 60% d'entre eux souffraient d'une insuffisance cardiaque (IC). L'insuffisance cardiaque est un syndrome caractérisé par l'incapacité du myocarde à maintenir au repos et à l'effort un débit sanguin suffisant pour fournir l'apport d'énergie nécessaire à l'organisme. Elle peut être l'aboutissement de plusieurs affections cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, les cardiomyopathies, les myocardites, les lésions du muscle cardiaque consécutives à un infarctus du myocarde ou une dissection aortique. Une étude a montré que 63% des patients atteints d'infarctus du myocarde souffrent d'une insuffisance cardiaque dans les 6 ans post-infarctus <sup>2</sup>. L'apparition d'une insuffisance cardiaque doit être compensée par l'organisme : augmentation du rythme cardiaque, dilatation puis hypertrophie du cœur. La transition entre remodelage adaptatif et maladaptatif, qui conduit notamment à une hypertrophie du ventricule gauche et/ou à une fibrose partielle du myocarde (remplacement progressif des cardiomyocytes par des fibroblastes), est l'une des causes principales de l'apparition de l'insuffisance cardiaque.

#### 4.1°) Les différents types d'insuffisance cardiaque

L'IC est difficile à définir, la terminologie elle-même est en constante évolution <sup>66</sup>. A l'heure actuelle, on distingue plusieurs formes d'IC, majoritairement l'IC systolique et l'IC diastolique. L'IC systolique est la conséquence d'une défaillance de la contractilité cardiaque alors que l'IC diastolique représente une anomalie de remplissage des cavités cardiaques.

Une IC peut être localisée dans la partie gauche du cœur (IC gauche), dans la partie droite (IC droite), ou affecter les parties droite et gauche en même temps (IC globale). La terminologie IC aiguë ou IC chronique est également souvent employée, cependant la Société Européenne de Cardiologie publie régulièrement des mises au point concernant les symptômes, traitements, formes d'IC et encourage les cliniciens à employer de moins en moins cette terminologie. Le **Tableau 1** présente la terminologie actuelle recommandée pour définir l'IC lorsque le patient se présente à l'hospitalisation.

**Tableau 1 :** classification de l'insuffisance cardiaque basée sur la nature des symptômes à l'hospitalisation (d'après Dickstein et coll., 2008 <sup>66</sup>)

<b>Classification de l'insuffisance cardiaque</b>	
<b>De novo</b>	Première présentation, apparition brutale ou lente
<b>Transitoire</b>	Récurrente ou épisodique
<b>Chronique</b>	Persistante, stable, aggravée ou décompensée

#### 4.2°) Dysfonction systolique versus diastolique

L'anomalie de contraction (dysfonction systolique) et l'anomalie de remplissage des cavités cardiaques (dysfonction diastolique) entraînent toutes deux une diminution du débit cardiaque.

La dysfonction systolique est évaluée en mesurant la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). Ce paramètre physique correspond au rapport entre le volume d'éjection systolique (volume du ventricule vidé par la contraction musculaire) et le volume d'éjection diastolique (ventricule rempli de sang). Ce

paramètre est en général supérieur à 60% chez l'individu sain et est inférieur chez l'individu présentant une anomalie de la contractilité. La conséquence d'une dysfonction systolique est l'augmentation du rythme cardiaque (tachycardie).

La dysfonction diastolique est plus difficile à diagnostiquer car elle dépend de l'élimination des symptômes de la dysfonction systolique. Elle provoque une hypertrophie et une rigidité du cœur mais a tendance à ne pas affecter la contraction (FEVG préservée).

Bien que la distinction soit faite entre les anomalies engendrées par ces 2 types d'IC, elles doivent être considérées comme une seule et même entité car, dans de nombreux cas, les patients hospitalisés présentent des symptômes liés à des anomalies de la systole ainsi que de la diastole<sup>67</sup>. De plus, les traitements, la prise en charge et le taux de mortalité de ces 2 pathologies sont généralement les mêmes.

#### **4.3°) Diagnostic et traitements**

Le diagnostic d'une IC est difficile à établir. C'est une pathologie complexe, le temps étant le critère principal pour une bonne prise en charge des patients. Les symptômes cliniques observés sont les suivants : essoufflement au repos ou à l'effort, fatigue. Ces symptômes sont très difficiles à interpréter notamment si le patient est à un âge avancé ou s'il souffre d'obésité. Les signes cliniques d'une IC sont : tachycardie, tachypnée, râles pulmonaires, épanchement pleural, augmentation de la pression jugulaire, œdème périphérique, hépatomégalie. Enfin, les preuves objectives d'une anomalie cardiaque structurale ou fonctionnelle au repos sont : cardiomégalie, murmures cardiaques, entre autres<sup>66</sup>.

La sévérité de l'IC est bien souvent établie en fonction d'une classification fonctionnelle créée par la New York Heart Association (NYHA). Cette classification en 4 classes est subjective, elle permet de mesurer la tolérance d'un patient à l'effort (**Tableau 2**).

**Tableau 2 :** classification fonctionnelle NYHA basée sur les symptômes observés en cas d'activité physique

Classification fonctionnelle New York Heart Association	
Score	Symptômes
I	Aucun symptôme, activité physique possible, travail possible
II	Symptômes légers, essoufflement, toux en cas d'efforts violents, signes d'insuffisance cardiaque en cas d'effort soutenu
III	Symptômes aggravés, légère intolérance à l'effort, signes d'insuffisance cardiaque en cas d'effort modéré
IV	Symptômes sévères, intolérance totale à l'effort, insuffisance cardiaque même au repos

Ce critère est actuellement disponible dans le suivi médical des patients mais tend à être complété voire remplacé, au fur et à mesure des années, par des classifications de type structurale et non plus fonctionnelle (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** classification structurale de l'American College of Cardiology et de la Société Européenne de Cardiologie (d'après Hunt et coll., 2005 <sup>68</sup>)

Classification structurale American College of Cardiology/European Society of Cardiology	
Stade	Structure et dommages cardiaques
A	Risque élevé de développer une insuffisance cardiaque. Aucune anomalie structurale ou fonctionnelle détectée. Aucun signe ni symptôme.
B	Cardiopathie structurale développée, fortement associée avec le développement d'une insuffisance cardiaque mais sans symptômes ni signes.
C	Insuffisance cardiaque symptomatique associée avec une cardiopathie structurale sous-jacente
D	Cardiopathie structurale avancée avec symptômes marqués d'insuffisance cardiaque au repos malgré la médication maximale recommandée

Diagnostiquer une IC passe également par la compréhension de son étiologie. Les principales causes de l'IC sont les affections myocardiques : cardiopathies coronaires, hypertension, cardiomyopathies, usage de médicaments ( $\beta$ -bloquants, antagonistes du calcium, antiarythmiques, etc.), toxines (alcool, stupéfiants, métaux lourds, etc.), dérégulation du système endocrinien (diabète, hypo- et hyperthyroïdie,

etc.), déficience nutritionnelle (obésité, etc.), pathologies à infiltrats (sarcoïdose, amyloïdose), infections (VIH).

Les différents outils pour confirmer le diagnostic d'une IC disponibles sont généralement : électrocardiogramme (ECG), radiographie pulmonaire, tests biochimiques des biomarqueurs diagnostiques (mesures des peptides natriuretiques, des troponines et des marqueurs neurohormonaux), échocardiographie et imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les traitements de l'IC sont de nature pharmacologique ou non pharmacologique. Les traitements par agents pharmacologiques incluent : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) <sup>69</sup>,  $\beta$ -bloquants <sup>70, 71, 72</sup>, diurétiques (spironolactone) <sup>73</sup>, antagonistes du calcium entre autres. Les traitements ne faisant pas appel à des agents pharmacologiques incluent : thérapies de resynchronisation cardiaque, pose de pacemakers, de défibrillateurs et transplantation cardiaque entre autres <sup>66</sup>.

## Chapitre 2 : remodelage myocardique

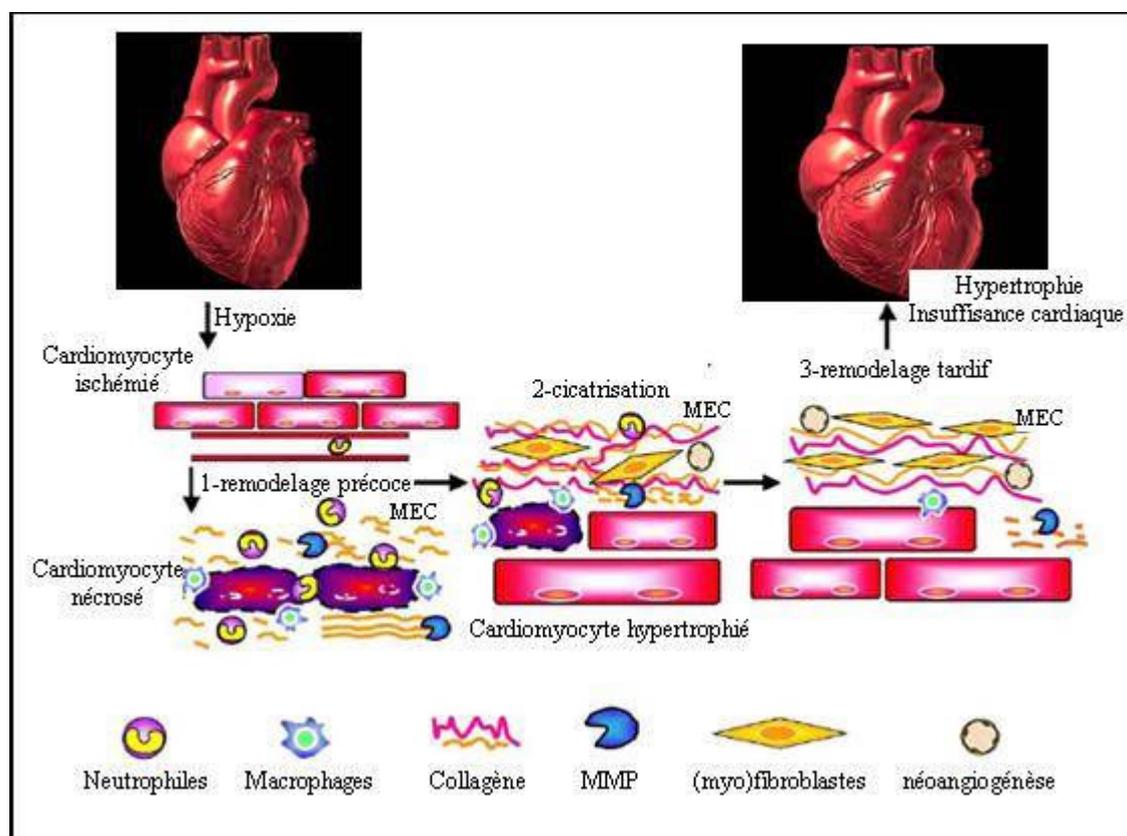
L'infarctus du myocarde, majoritairement dû à l'athérosclérose, est suivi d'une période ischémique, puis d'une reperfusion. Le mécanisme de reperfusion provoque des dommages myocardiques et l'installation d'une inflammation aboutissant à une réorganisation de la matrice extracellulaire cardiaque et à la formation de la cicatrice. Ces mécanismes s'inscrivent dans le remodelage myocardique, sont complémentaires et se chevauchent parfois <sup>57</sup>. Leur dérégulation conduit à l'installation d'une insuffisance cardiaque. L'objectif de ce chapitre est de donner un aperçu des mécanismes d'inflammation, de cicatrisation et d'hypertrophie impliqués dans le développement du remodelage myocardique post IM.

### 1°) Remodelage myocardique

#### 1.1°) Mécanismes fondamentaux

La rupture d'une lésion athérosclérotique provoque l'occlusion de l'artère coronaire et la survenue d'un IM s'accompagnant de la mort cellulaire irréversible des cellules cardiaques et de la nécrose du myocarde <sup>74</sup>. Le cœur va alors subir des altérations architecturales. Ce processus, appelé remodelage myocardique, principalement localisé au niveau du ventricule gauche, se met en place au niveau des zones infarctées et non infarctées. Il correspond à une réorganisation structurale de la matrice extracellulaire cardiaque (MEC). Le remodelage est un processus long, s'établissant sur plusieurs mois, devant en théorie restaurer la contractilité cardiaque et l'intégrité fonctionnelle du cœur. Son étendue dépend de la taille de la zone infarctée et du temps de reperfusion après IM <sup>75</sup>. Le remodelage fait également appel à un ensemble de mécanismes interconnectés tels que la mise en place d'une réaction inflammatoire, d'une hypertrophie cardiaque et la formation d'un tissu cicatriciel <sup>53</sup>. La dérégulation de ce processus conduit à l'insuffisance cardiaque <sup>76</sup>. Au niveau de la fenêtre cinétique du remodelage, nous pouvons distinguer 3 phases : une phase dite précoce (1 à 7 jours post IM) correspondant à l'installation de la réponse inflammatoire, une phase de cicatrisation avec la mise en place d'un tissu de granulation (du 7<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour post IM), puis un remodelage dit tardif (21<sup>ème</sup> jour

post-IM) correspondant à la reconstruction de l'architecture myocardique. Les phases du remodelage sont représentées **Figure 3**.



**Figure 3 :** mise en place du remodelage du ventricule gauche après infarctus du myocarde (d'après Vanhoutte *et coll.*, 2006<sup>57</sup>)

*Le cœur subit une ischémie (infarctus du myocarde), 1. Les cardiomyocytes nécrosés sont phagocytés puis remplacés par des (myo)fibroblastes qui synthétisent une matrice provisoire et par des cellules endothéliales qui favorisent la néovascularisation de la zone, cette action est médiée par les leucocytes via la réponse inflammatoire 2. L'action combinée des (myo)fibroblastes et des cellules endothéliales forme le tissu de granulation et l'établissement de la cicatrice 3. Le remodelage tardif contribue à réorganiser la matrice pour retrouver l'architecture de départ. Durant ce processus, le cœur est hypertrophié de façon à maintenir le débit cardiaque MEC : matrice extracellulaire, MMPs : métalloprotéinases matricielles.*

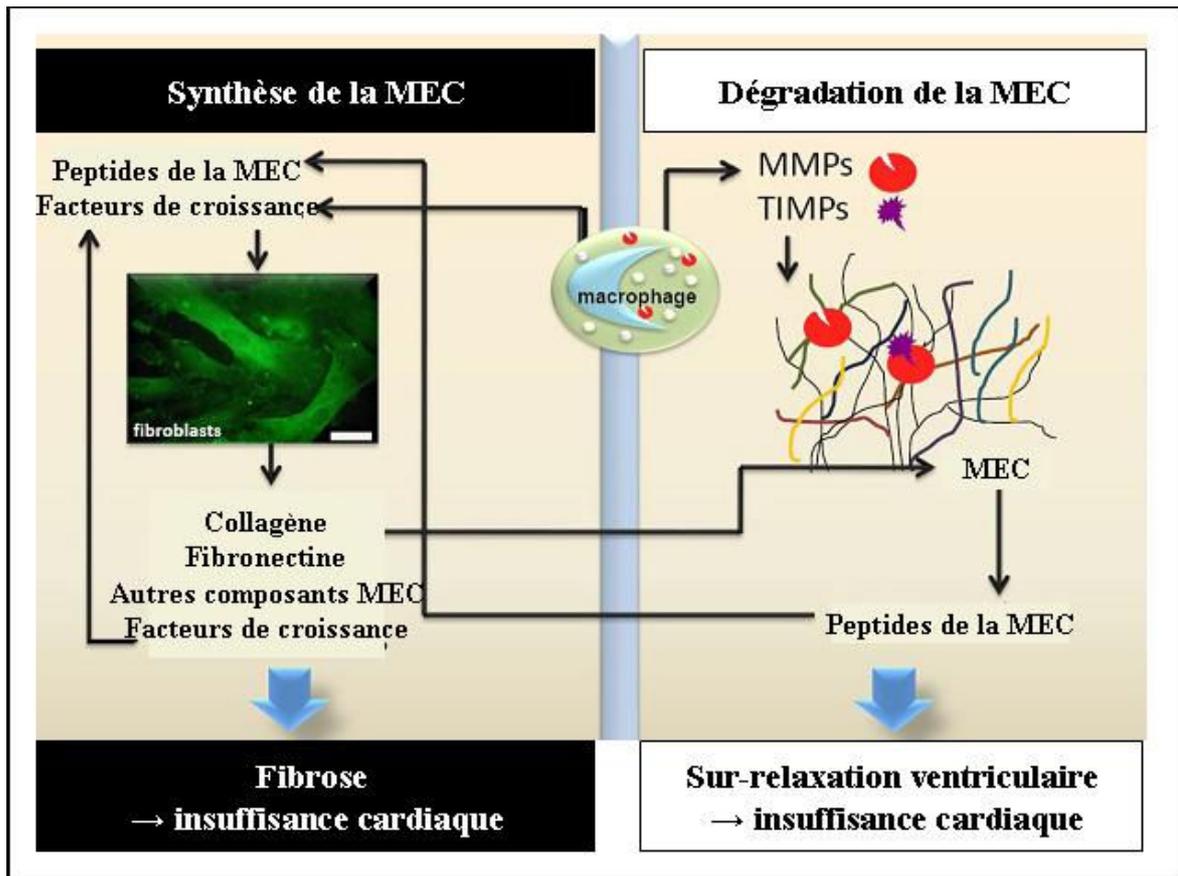
## 1.2°) Matrice extracellulaire cardiaque

La matrice extracellulaire cardiaque représente un ensemble complexe de protéines interconnectées permettant le maintien de l'architecture cardiaque ainsi que l'exercice fonctionnel des cellules présentes au sein de cette structure, *id est* la contractilité et le volume cardiaques<sup>77</sup>. Elle entoure les cardiomyocytes, fibroblastes, myofibroblastes (capables de contraction) et cellules endothéliales. Sa composition est complexe, elle contient majoritairement du collagène et de l'élastine, ainsi que des protéines plus spécialisées telles que la fibrilline, la fibonectine, les protéoglycanes et les protéines matricielles.

Le collagène est organisé en fibres qui forment un réseau charpentant et préservant le myocarde<sup>78, 79, 80</sup>. La MEC favorise la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires, ce qui fait le lien entre les cellules et les fonctions tissulaires.

Le maintien et la dégradation/synthèse des composants de la MEC sont réalisés principalement par les fibroblastes, le type cellulaire majoritaire du myocarde (75% de la population cellulaire pour 10% du volume myocardique<sup>50</sup>). Les fibroblastes régulent la MEC à 3 niveaux : régulation de la synthèse et du dépôt des constituants matriciels, dégradation et renouvellement de la MEC au moyen d'enzymes appelées métalloprotéinases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs), maintien du réseau de fibres de collagène. Ce processus de remodelage contribue au renouvellement et au maintien de la MEC dans des conditions physiologiques normales<sup>50, 57</sup>.

Des déséquilibres entre synthèse et dégradation matricielles peuvent apparaître en réponse à un stress ; de tels déséquilibres conduisent : soit à une rigidité cardiaque (fibrose par dépôt massif de collagène dans la zone infarctée et dans la zone non infarctée du myocarde) lorsque les mécanismes de synthèse de composants matriciels sont favorisés et dont l'aboutissement est l'installation d'une IC ; soit à une relaxation cardiaque trop abondante, aboutissant à une hypertrophie ventriculaire, puis à l'IC. Un schéma présentant ces déséquilibres est présenté **Figure 4**.



**Figure 4 :** déséquilibres entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque avec certains types cellulaires impliqués et les pathologies résultantes (d'après Zamilpa *et coll.*, 2010<sup>81</sup>)

*MEC* Matrice Extracellulaire *MMP* Métalloprotéinase Matricielle *TIMP* Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases Matricielles

### 1.3°) Les métalloprotéinases matricielles

Les MMPs sont les principaux modulateurs de la dégradation de la MEC<sup>82</sup>. Étant donnée la nature complexe de la MEC et les spécificités de substrats enzymatiques, les MMPs sont nombreuses<sup>83</sup>.

### 1.3.1°) Structure et fonction

Ce sont des endoprotéases à zinc catalytique qui sont les plus impliquées dans le remodelage matriciel. 25 MMPs ont été dénombrées jusqu'à présent (dont 23 chez l'Homme <sup>83</sup>), leur structure est hautement conservée <sup>84</sup>. Selon leurs spécificités et leurs substrats préférentiels, elles peuvent être classées en au moins 5 groupes distincts : collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines et MMPs de type membranaire (MT-MMPs) <sup>57</sup>. Les différentes MMPs présentent un certain nombre de caractéristiques communes : elles sont capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire, contiennent un ion  $Zn^{2+}$  au niveau de leur site actif et sont inhibées par les agents chélateurs (EDTA) et par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs). Enfin, elles sont sécrétées sous forme latente (pro-enzyme) et requièrent une activation dans l'espace extracellulaire pour exercer leur activité protéolytique. Elles ne sont pas toutes exprimées au niveau du cœur post-infarctus du myocarde <sup>57</sup>. Le **Tableau 4** présente les différentes MMPs exprimées dans le cœur.

**Tableau 4 :** métalloprotéinases matricielles exprimées dans le cœur après infarctus du myocarde, substrats et cellules productrices (d'après Spinale, 2002 et 2007 <sup>23, 85</sup> et Vanhoutte, 2006 <sup>57</sup>)

Classe	Code	Produit par	Principaux substrats
<b>Collagénases</b>			
interstitielle	MMP-1	Fibroblastes	Collagènes I, II, III et VII et composants de la membrane basale, proMMP-2 et proMMP-9
Collagénase 2	MMP-8	Neutrophiles	Collagènes I, II et III
Collagénase 3	MMP-13	Non déterminé	Collagènes I, II et III
<b>Gélatinases</b>			
Gélatinase A	MMP-2	Macrophages, (myo)fibroblastes et myocytes	Gélatines, collagènes I, IV, V, VII et composants de la membrane basale
Gélatinase B	MMP-9	Neutrophiles, macrophages et myocytes	Gélatines, collagènes IV, V, XIV et composants de la membrane basale
<b>Stromélysines</b>			
Stromélysine-1	MMP-3	Myocytes	Fibronectine, laminine, collagènes III, IV, IX et MMPs
<b>Matrilysines</b>			
Matrilysine	MMP-7	Non déterminé	Collagènes I, III et IV, fibronectine, laminine et élastine
<b>MMPs de type membranaire</b>			
MT1-MMP	MMP-14	Fibroblastes, cellules musculaires lisses vasculaires, myocytes	Collagènes I, II, III, fibronectine, laminine-1, proMMP-2 et proMMP-13

Le **Tableau 5** présente un résumé des effets observés lors d'une extinction d'expression ou d'une surexpression des MMP-s cardiaques.

**Tableau 5 :** métalloprotéinases matricielles exprimées dans le cœur après infarctus du myocarde, phénotype obtenu après extinction ou surexpression (d'après Vanhoutte, 2006<sup>57</sup>)

Classe	Code	Phénotype KO	Phénotype Transgénèse
<b>Collagénases</b>			
interstitielle	MMP-1	Non déterminé	Hypertrophie et dilatation cardiaque
Collagénase 2	MMP-8	Non déterminé	Non déterminé
Collagénase 3	MMP-13	Non déterminé	Non déterminé
<b>Gélatinases</b>			
Gélatinase A	MMP-2	Atténuation de la réponse inflammatoire, de la dilatation du ventricule gauche, réduction du dépôt de collagène	Non déterminé
Gélatinase B	MMP-9	Atténuation de la réponse inflammatoire, de la dilatation du ventricule gauche, réduction du dépôt de collagène	Non déterminé
<b>Stromélysines</b>			
Stromélysine-1	MMP-3	Aucun phénotype observé	Non déterminé
Matrilysine	MMP-7	Non déterminé	Non déterminé
<b>MMPs de type membranaire</b>			
MT1-MMP	MMP-14	Non déterminé	Non déterminé

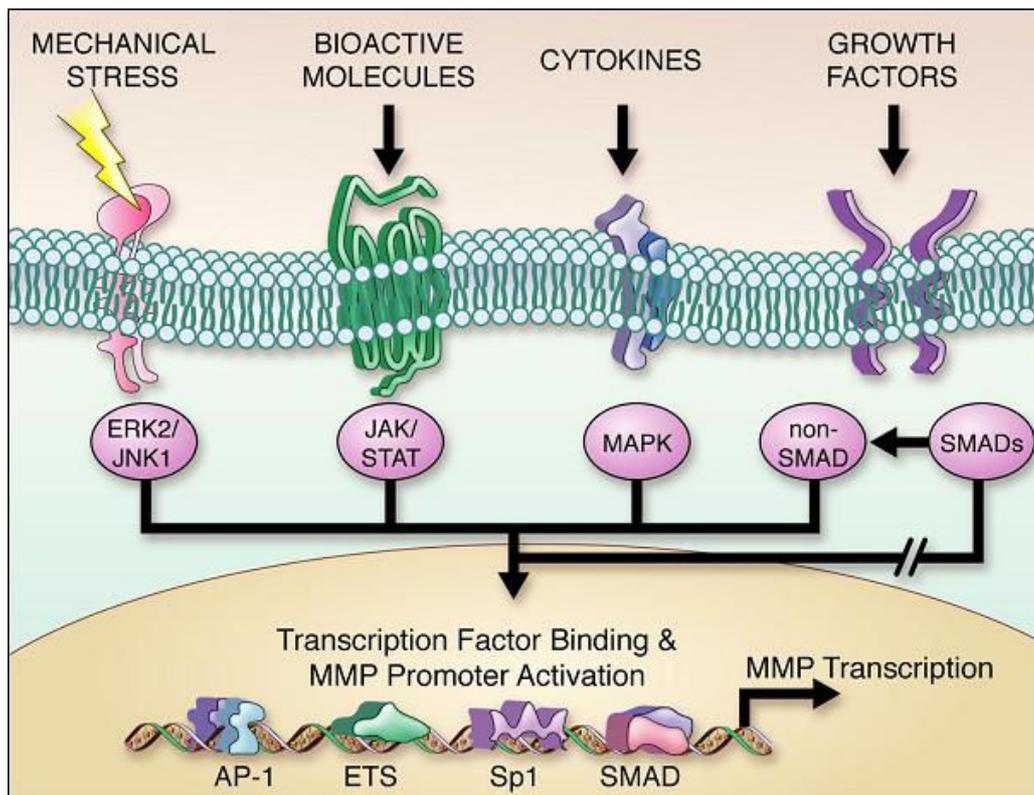
### 1.3.2°) Synthèse, activation et régulation

La synthèse et l'activation des MMPs sont hautement régulées. Cette régulation a lieu à plusieurs niveaux : la transcription des gènes, la sécrétion, l'activation de la forme zymogène, l'inhibition par interaction avec inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs), et enfin les modifications post-traductionnelles.

Lorsque les MMPs sont synthétisées en réponse à un stimulus, elles sont sécrétées dans l'espace extracellulaire par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les myocytes et les cellules endothéliales où elles vont se lier à la MEC sous leur forme zymogène inactive.

Elles requièrent une activation qui peut se faire par des protéases (serine protéase de type trypsine, chymotrypsine, plasmine) ou par le biais d'autres MMPs (MT-MMPs) générant une cascade d'activation <sup>86, 87-91</sup>. Comme dans toutes les cascades d'activation, la génération de l'enzyme active est finement régulée. La conformation de la forme zymogène est maintenue par une interaction entre un résidu cystéine du pro-domaine et l'atome de zinc du site catalytique des MMPs. Après rupture de cette coordination (« cysteine switch »), un changement conformationnel se produit et l'atome de zinc devient accessible au substrat.

La transcription des gènes codant les MMPs est une étape déterminante de leur synthèse. Elle est activée en réponse à des stimuli de nature mécanique <sup>92</sup> ou biologique qui activent un certain nombre de facteurs de transcription (AP-1, NFκB, etc.). Les stimuli biologiques modifiant la transcription des MMPs sont : des molécules bioactives telles que l'angiotensine II <sup>93, 94</sup> (peptide à effet vasoconstricteur impliqué dans l'hypertension artérielle) ; des cytokines et chimiokines telles que le TNF-α <sup>95, 96</sup> et l'IL-1β <sup>97</sup> ; des protéines matricellulaires telles que les thrombospondines <sup>98, 99</sup> et ostéopontines <sup>100</sup> ; des facteurs de croissance tels que les Transforming Growth Factors (TGFs) qui possèdent des propriétés pro-fibrotiques <sup>101, 102</sup>. Un schéma récapitulatif des différents stimuli modulant la transcription des MMPs est présenté **Figure 5**. Un rôle des ROS générés suite à une ischémie/reperfusion a également été mis en évidence dans la modulation de la transcription des MMPs <sup>103</sup>.



**Figure 5 :** régulation de la transcription des MMPs en réponse à différents stimuli (d'après Spinale, 2007<sup>23</sup> et Thomas, 1998<sup>104</sup>)

*AP-1 Activator Protein ERK Extracellular signal-Regulated Kinase ETS E-Twenty Six JAK Janus Kinase JNK c-Jun N-terminal Kinase MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase MMP Matrix Metalloproteinase STAT Signal Transducer and Activator of Transcription*

Les MMPs font également l'objet de modifications post-traductionnelles, la plupart ciblant le prodomaine. En effet, la survenue d'un stress oxydant est à l'origine de modifications du prodomaine ou de la structure intégrale permettant l'activation de l'enzyme<sup>105, 106</sup>. D'autres modifications sont importantes pour le transport et la sécrétion des MMPs, notamment des O-glycosylations.

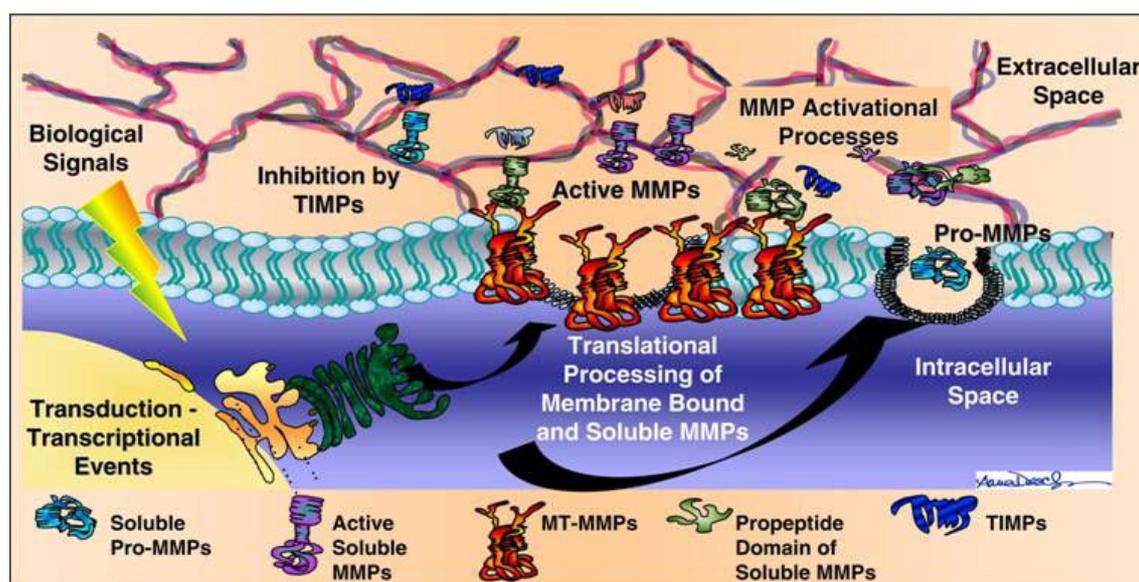
Le principal système de régulation de l'activité des MMPs est leur interaction avec les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs). Ces inhibiteurs endogènes sont au nombre de 4, ils se lient aux MMPs actives de façon stœchiométrique (rapport 1 :1) et agissent par compétition avec le substrat des MMPs. Les différents TIMPs, ainsi que les conséquences d'une extinction de leur expression

sont présentés **Tableau 6**. L'équilibre entre la quantité de MMPs et de TIMPs est essentiel au maintien et au renouvellement de la MEC. Une perturbation de cet équilibre au profit des MMPs entraîne une hypertrophie cardiaque conduisant à l'établissement d'une IC, alors qu'une perturbation au profit des TIMPs entraîne une fibrose et une rigidité cardiaques dont l'issue est identique. L'établissement de telles perturbations est fréquent post-IM<sup>107, 108</sup> et fait des MMPs et des TIMPs des régulateurs essentiels de la fonction cardiaque, ainsi que des cibles thérapeutiques potentielles<sup>81</sup> (**Tableaux 5 et 6 phénotypes KO ou surexprimés**).

**Tableau 6 :** inhibiteurs tissulaires des MMPs et effets d'une extinction de leur expression (d'après Vanhoutte, 2006<sup>57</sup>)

Inhibiteur	Produit par	Phénotype KO
TIMP-1	Fibroblastes/myocytes	Hypertrophie/remodelage maladaptatif
TIMP-2	Fibroblastes/myocytes	Non déterminé
TIMP-3	Fibroblastes/myocytes	Hypertrophie/dilatation/dysfonction contractile
TIMP-4	Fibroblastes/myocytes	Non déterminé

Un schéma résumant les concepts actuels de modifications post-traductionnelles et de régulation des MMPs par les TIMPs est présenté **Figure 6**.



**Figure 6 :** régulation de l'activité protéolytique des MMPs dans l'espace myocardique (d'après Spinale et Deschamps, 2007<sup>23</sup>)

*En réponse à des stimuli de nature mécanique et/ou biologique, les MMPs sont synthétisées et subissent des modifications post-traductionnelles nécessaires à leur fonction. Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles seront activées par protéolyse de leur prodomaine inhibiteur. Leur activité est régulée par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs). MMP Matrix Metalloproteinase MT-MMP Membrane-Type MMP TIMP Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*

#### **1.4°) La MMP- 9 et TIMP-1**

Parmi les différentes MMPs exprimées dans le cœur, la MMP-9, également appelée gélatinase B, joue un rôle prépondérant. Son principal substrat est la gélatine (collagène dénaturé). La forme latente de la MMP-9 (92 kDa) est sécrétée dans l'espace extracellulaire et requiert une activation par protéolyse d'un fragment de 10 kDa à l'extrémité N-terminale de la pro-enzyme. L'inhibiteur TIMP-1 est l'inhibiteur principal de la MMP-9 dans le tissu cardiaque.

La MMP-9 est principalement exprimée par les neutrophiles, monocytes/macrophages, (myo)fibroblastes, myocytes et cellules endothéliales<sup>57</sup>. Son expression est augmentée très rapidement consécutivement à un IM<sup>109, 110</sup>, accompagnant l'installation d'une réponse inflammatoire aiguë<sup>111, 112</sup>.

Une surexpression et suractivation de la MMP-9 produisent un remodelage délétère et conduisent à l'insuffisance cardiaque<sup>22, 24, 25, 113</sup>. Un déséquilibre entre MMP-9 et TIMP-1 se produit chez l'humain après un IM, lors de la reperfusion<sup>110</sup>. Les mêmes constatations ont été faites chez le rongeur<sup>107, 114</sup>.

De plus, des études ont montré qu'une inhibition pharmacologique de la MMP-9 post IM améliore le pronostic chez la souris<sup>28</sup> et le rat<sup>114</sup> en diminuant l'impact du remodelage. De la même façon, l'ablation génétique de l'expression de la MMP-9 augmente la néovascularisation de la zone infarctée chez la souris<sup>115</sup> et réduit l'hypertrophie et la dilatation<sup>111</sup>, sans affecter la taille de l'infarctus.

En tenant compte de tous ces éléments, nous pouvons considérer la MMP-9 comme une cible thérapeutique potentielle de l'IC post IM.

## 2°) Inflammation

La reperfusion de la zone infarctée permet de stabiliser la progression de la lésion mais s'accompagne d'une réaction inflammatoire aiguë. Cette inflammation est principalement induite par l'activation des systèmes immunitaires inné et adaptatif, et peut exacerber les dommages tissulaires. Cette dichotomie est l'objet de nombreuses études, l'enjeu majeur étant d'élucider ces mécanismes inflammatoires<sup>53, 54</sup>.

L'ischémie/reperfusion est suivie par des événements hypoxiques locaux et la mise en place d'une réaction inflammatoire qui conduit au recrutement de leucocytes. Cette inflammation produit des dommages à l'intérieur et autour de la zone infarctée mais est nécessaire au processus de guérison et de cicatrisation<sup>116, 117</sup>. Les dommages myocardiques résultant de l'ischémie provoquent une diminution de l'apport en oxygène, diminuant la synthèse d'ATP, ce qui conduit à une panne des transporteurs ioniques à sodium et potassium, de l'influx de calcium et d'eau et provoque une hypertrophie cellulaire, surtout au niveau des cardiomyocytes. Une période ischémique de quelques secondes seulement suffit à conditionner les cellules cardiaques à utiliser de l'ATP par les voies anaérobies, ce qui provoque une accumulation de produits de dégradation de cette voie tel que le lactate. En quelques minutes, la contractilité cellulaire est affectée, la morphologie des cardiomyocytes et de leurs mitochondries change (de façon encore réversible), présentant une hypertrophie. Après 20 à 40 minutes d'ischémie, les cardiomyocytes subissent des dommages irréversibles, notamment une rupture de leur membrane sarcolemique et des modifications mitochondriales irréparables conduisant à la nécrose d'une partie du myocarde<sup>53</sup>. L'ischémie conduit à une dysfonction endothéliale accompagnée d'une augmentation de la perméabilité et de l'expression de molécules d'adhésion recrutant des leucocytes, ce qui provoque une réaction inflammatoire aiguë faisant appel à la fois aux mécanismes de l'immunité innée et adaptative.

Pendant la première semaine suivant un infarctus du myocarde, dans la phase de remodelage précoce, les MMPs présentes au niveau de la zone infarctée dégradent la MEC et permettent l'infiltration de cellules de l'inflammation : les polynucléaires neutrophiles qui constituent la 1<sup>ère</sup> vague cellulaire et les monocytes qui, en s'infiltrant dans le tissu lésé, se différencient en macrophages et constituent la 2<sup>nde</sup> vague cellulaire. Ces cellules libèrent de grandes quantités de MMPs (MMP-9 et MMP-2

principalement), des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et anti-inflammatoires (IL-10), quelques facteurs pro-angiogéniques (VEGF, TGF- $\beta$ ) qui vont faciliter la néovascularisation de la zone infarctée, ainsi que des médiateurs vasodilatateurs (prostaglandines, monoxyde d'azote) et vasoconstricteurs (thromboxanes). Cependant, lorsqu'un stress oxydatif intense se déclenche au niveau de la zone infarctée, ou lorsque la régulation de la pression sanguine est rompue, le processus de remodelage devient délétère et conduit à une insuffisance cardiaque. L'action des polynucléaires neutrophiles est immédiate et peu ciblée en comparaison avec l'action des macrophages qui dégradent la MEC afin de phagocyter progressivement les cardiomyocytes nécrosés. De plus, les neutrophiles représentent une source de destruction du tissu myocardique car lorsqu'ils s'accumulent, la nécrose myocardique est amplifiée.

Les monocytes s'infiltrent dans le myocarde en suivant un gradient de protéines chimioattractives comme la MCP-1, *via* l'activation du récepteur aux chimiokines CCR-2, ils se différencient en macrophages et s'accumulent dans la zone lésée <sup>118</sup>.

D'autres types cellulaires sont impliqués dans l'ischémie/reperfusion, l'inflammation et le remodelage : mastocytes, lymphocytes T, cellules dendritiques, plaquettes et cellules endothéliales <sup>119</sup> mais ne seront pas traités dans cette étude bibliographique.

## 2.1°) Cytokines, chimiokines, stress oxydant

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  principalement) dans le myocarde consécutivement à un IM ou dans le contexte d'une IC chronique <sup>120</sup>. Le TNF- $\alpha$  est synthétisé/relargué par les cardiomyocytes et les cellules immunitaires comme les macrophages et est capable d'induire localement l'apoptose des cardiomyocytes, contribuant ainsi à la dysfonction myocardique <sup>120</sup>. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote est également mis en évidence dans la dysfonction myocardique due à l'ischémie/reperfusion. Tous ces médiateurs permettent le recrutement des leucocytes au niveau de la zone infarctée <sup>53, 54, 117</sup>.

## 2.2°) Activation du complément

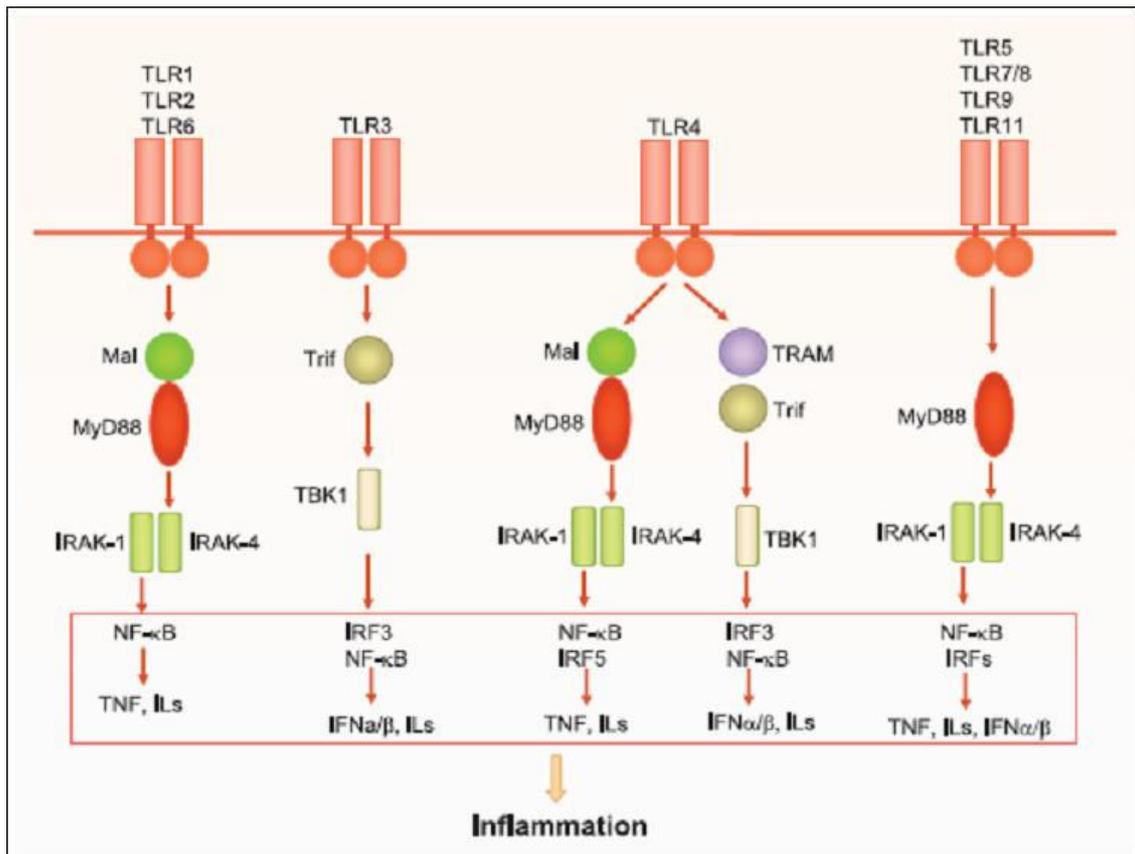
La cascade d'activation du complément a été mise en évidence consécutivement à une ischémie myocardique. La nécrose des cellules résidentes est provoquée par des constituants membranaires subcellulaires mitochondriaux capable d'activer le complément<sup>121-123</sup>. Les constituants de la cascade du complément sont surexprimés, tant au niveau ARNm que protéine<sup>124</sup>, dans le myocarde post infarctus et un traitement anti-complément à l'aide d'anticorps monoclonaux réduit l'infiltration leucocytaire dans le myocarde, l'apoptose et la nécrose des cellules résidentes chez le rat<sup>125</sup>.

L'activation du complément a été constatée dans plusieurs modèles animaux d'ischémie/reperfusion et l'inhibition du complément pourrait présenter un intérêt thérapeutique<sup>126-129</sup>.

## 2.3°) Les récepteurs de l'immunité innée de type Toll

Les récepteurs de l'immunité innée de type Toll (TLRs) appartiennent à la famille des Pattern-Recognition Receptors (PRRs) et reconnaissent des motifs moléculaires conservés naturellement associés à des pathogènes (PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns). La famille des TLRs compte 13 membres, dont 10 sont exprimés chez l'Homme<sup>130, 131</sup>.

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires contenant un domaine extracellulaire avec des motifs « leucine-rich » répétés, ainsi qu'un domaine intracellulaire nommé TIR (Toll/IL-1 Receptor). La liaison des TLRs à leurs ligands provoque l'activation de kinases et de facteurs de transcription (NFκB par exemple), ce qui conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires. La signalisation intracellulaire consécutive à l'activation des TLRs est présentée sur la **Figure 7**.



**Figure 7 :** signalisation intracellulaire des récepteurs de type Toll (d'après Chao et coll., 2009<sup>132</sup>)

Suite à l'activation des TLRs, les récepteurs sous forme dimérique vont déclencher un mécanisme de transduction du signal par l'intermédiaire de protéines adaptatrices qui vont activer des kinases intracellulaires capables, à leur tour, d'activer des facteurs de transcription qui vont initier la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme conduit à l'inflammation. Protéines adaptatrices : MyD88/MAL, TRIF. Kinases : IRAK 1/4, TBK1. Facteurs de transcription : NFκB, IRF3/5. Cytokines : TNF, ILs, IFN.

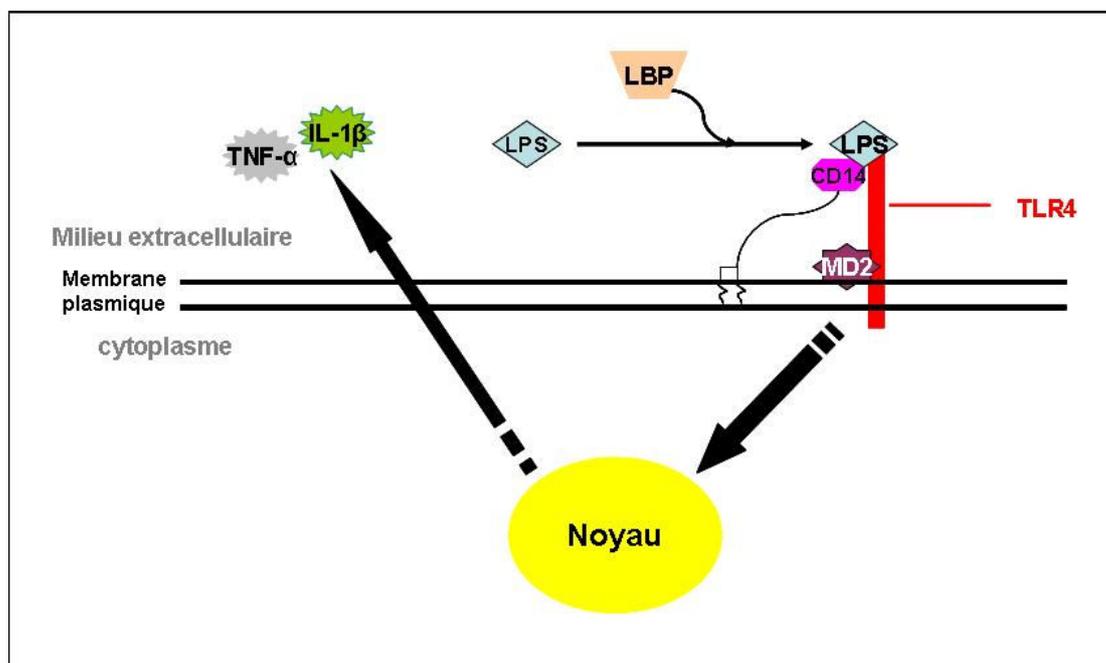
Indépendamment de leur rôle dans la défense anti-microbienne de l'organisme, les TLRs ont récemment été mis en évidence dans l'installation des réponses inflammatoires dans le cadre de pathologies non induites par des agents microbiens, notamment l'ischémie tissulaire, et en particulier dans l'ischémie myocardique<sup>133-136</sup>. Chez la souris, 6 TLRs sont exprimés au niveau du cœur : TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9<sup>137</sup>. La stimulation par les ligands prototypiques

de TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 active la voie NFκB et conduit à une dysfonction contractile chez les cardiomyocytes<sup>137, 138</sup>.

À l'heure actuelle, les 2 TLRs les plus abondamment étudiés dans la recherche biomédicale sur les pathologies cardiovasculaires sont TLR2 et TLR4<sup>9, 138-140</sup>. Cette thèse est dédiée en partie, à l'étude des mécanismes inflammatoires de la voie TLR4 ; les mécanismes moléculaires d'activation de TLR4 seront détaillés dans les sections suivantes.

## 2.4°) Le récepteur Toll-like 4

Le premier rôle connu de TLR4 est la reconnaissance du lipopolysaccharide bactérien LPS par les cellules immunitaires. Le LPS est un constituant de la paroi des bactéries à Gram négative. TLR4 fait partie du système de reconnaissance du LPS, composé de la protéine accessoire MD-2, du co-récepteur CD14, et de la protéine de liaison au LPS LBP. Lorsque le LPS circule dans le milieu extracellulaire, il est capté par LBP, puis présenté au complexe formé par le récepteur TLR4, le co-récepteur CD14 et la protéine MD2, ce qui aboutit à la transduction du signal et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (**Figure 8**).



**Figure 8 :** système de reconnaissance du LPS

*Le LPS circulant dans le milieu extracellulaire est capté par la LBP puis présenté au complexe TLR4/CD14/MD2, ce qui aboutit à la transduction du signal et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ .*

TLR4 est également exprimé dans le cœur post-infarctus, notamment par les cardiomyocytes <sup>9</sup>, ainsi que par les monocytes/macrophages <sup>141</sup>, les cellules endothéliales <sup>142</sup> et les fibroblastes de l'*adventitia* coronaire <sup>143 144</sup>. Le LPS n'est pas présent spontanément dans le cœur après IM. Toutefois, il a été démontré que des molécules cardiaques endogènes sont capables d'activer le TLR4 *via* la voie NF $\kappa$ B. Ces ligands cardiaques sont des composants de la MEC relargués suite à des dommages myocardiques, comme des dérivés de la fibronectine <sup>145</sup> ou de l'acide hyaluronique (hyaluronan) <sup>146, 147</sup>, ou encore de l'héparane sulfate <sup>11</sup>.

Nous avons montré, ainsi que d'autres équipes de recherche, que l'expression de TLR4 est augmentée consécutivement à l'IM chez l'Homme <sup>9, 148-150</sup>. De plus, l'inhibition de TLR4 au moyen d'antagonistes pharmacologiques réduit l'hypertrophie cardiaque <sup>151</sup>. D'après Timmers et collaborateurs, dans un modèle murin de ligature coronaire sans reperfusion, la délétion du gène TLR4 réduit la progression du remodelage au niveau du ventricule gauche et préserve la fonction systolique sans affecter la taille de l'infarctus <sup>10</sup>, le tout s'accompagnant d'une fibrose réduite et d'une diminution de l'expression des MMPs -9 et -2 <sup>10</sup>. D'autres modèles animaux d'ischémie/reperfusion ont également révélé que l'ablation génétique de TLR4 réduit la taille de l'infarctus et réduit l'inflammation <sup>152</sup>. Ces résultats ont été également obtenus par traitement pharmacologique avec des antagonistes du TLR4 <sup>153</sup>.

Ces constatations font de TLR4 une cible potentielle dans le traitement de l'inflammation post infarctus du myocarde, afin de stabiliser la lésion et de réduire l'impact d'un remodelage délétère.

### 3°) Tissu de granulation, formation de la cicatrice, remodelage tardif

La formation du tissu de granulation (7<sup>ème</sup>-21<sup>ème</sup> jour post-IM) est une étape déterminante du processus de remodelage du ventricule gauche et de la restauration de la fonction cardiaque. Les macrophages présents depuis la phase de remodelage précoce vont progressivement phagocyter les cardiomyocytes nécrosés, qui vont être petit à petit remplacés par des fibroblastes. Ces fibroblastes, sous l'impulsion de facteurs de différenciation, vont obtenir un phénotype de myofibroblastes pour tenter de pallier le déficit contractile<sup>53, 154</sup>. De plus, des cellules endothéliales vont également migrer dans cette zone et proliférer afin de favoriser la néovascularisation<sup>154</sup>.

Le tissu nécrosé est remplacé par le tissu de granulation, composé d'une matrice de collagène, de protéoglycanes et de protéines matricellulaires (ostéopontine et thrombospondines). Les myofibroblastes déposent du collagène qui s'organise en réseau. Petit à petit, les cellules de ce tissu de granulation entrent en apoptose pour laisser la place à une cicatrice très fine et les cardiomyocytes de la zone non infarctée s'hypertrophient pour compenser le déficit contractile<sup>57</sup>.

À partir du 21<sup>ème</sup> jour post-IM, le processus de remodelage tardif entre en jeu et s'étend sur plusieurs mois, voire plusieurs années. L'issue d'un tel remodelage est incertaine et peut conduire à une récupération de la fonction cardiaque ou à l'établissement d'une insuffisance cardiaque. Des inflammations chroniques peuvent se mettre en place, avec des infiltrations de leucocytes dans les bordures de la zone non infarctée. Les MMPs sont également impliquées dans le remodelage du début à la fin, avec des cycles d'activation/désactivation<sup>57</sup>.

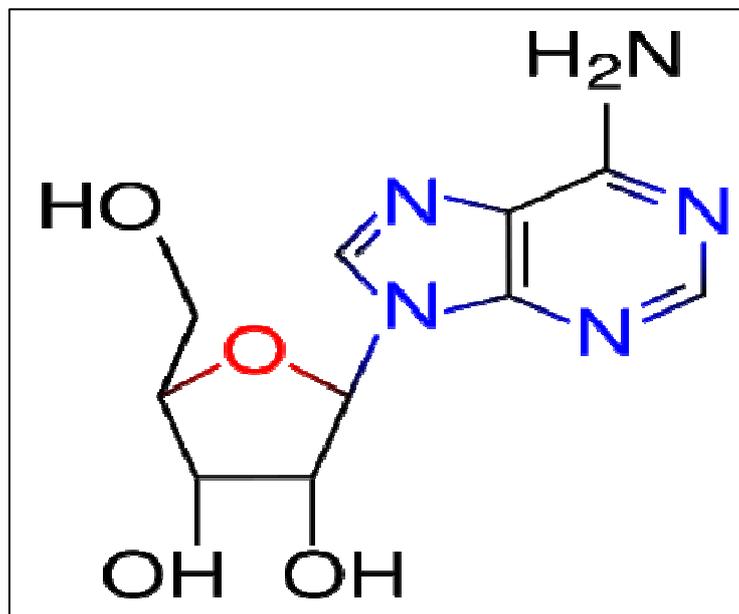
Les mécanismes brièvement présentés dans cette partie d'étude bibliographique soulèvent un point important, celui de la fenêtre thérapeutique, lorsque l'on veut comprendre et traiter cette pathologie complexe qu'est l'insuffisance cardiaque. La partie suivante sera consacrée à l'étude d'une molécule d'intérêt thérapeutique, de part ses propriétés anti-inflammatoires et cardioprotectrices, l'adénosine.

## Chapitre 3 : propriétés cardioprotectrices et anti-inflammatoires de l'adénosine

### 1°) L'adénosine

#### 1.1°) Structure et localisation

L'adénosine est un nucléoside formé d'un ribose et d'une base azotée adénine liés par une liaison N-glycosidique (**Figure 9**).

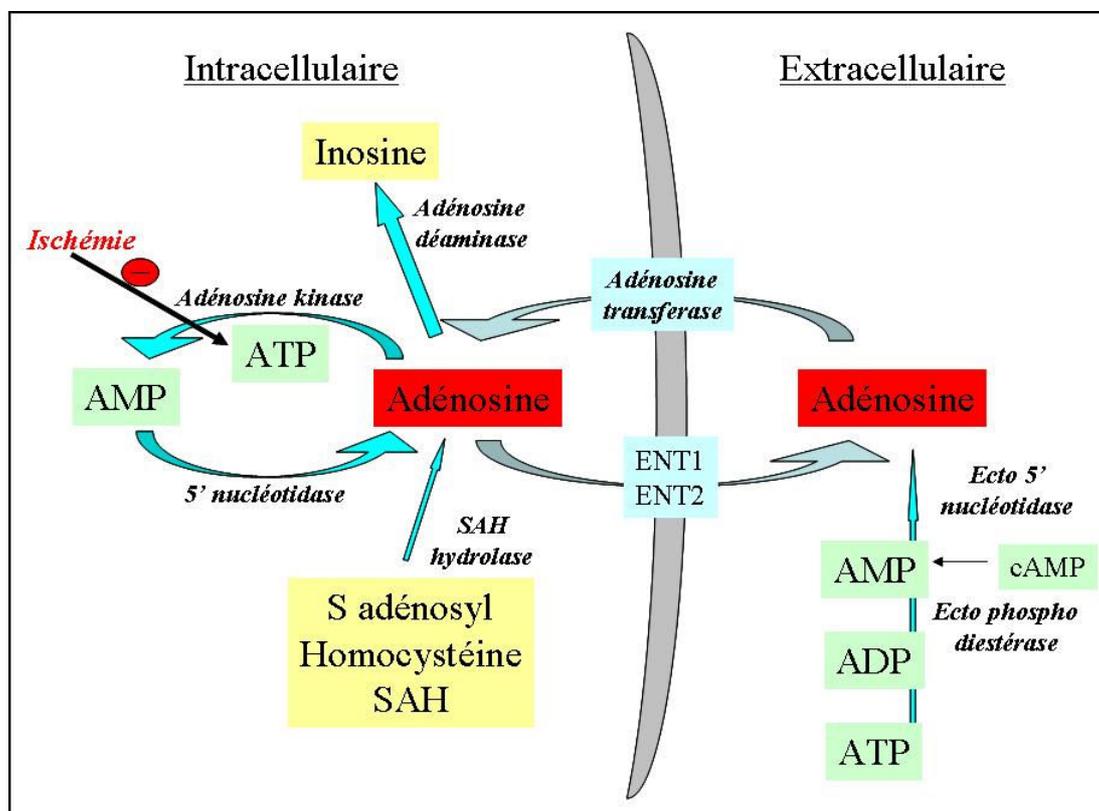


**Figure 9 :** formule chimique de l'adénosine

C'est à la fois un précurseur et un métabolite du nucléotide adénine. C'est une molécule ubiquitaire, en effet, toutes les cellules de l'organisme sont consommatrices d'énergie *via* le catabolisme de l'ATP dont l'adénosine est un produit terminal <sup>155</sup>. Elle est présente dans tous les organes (cœur <sup>156</sup>, foie, reins <sup>157</sup>, systèmes nerveux <sup>158</sup> et respiratoire <sup>159</sup>, organes reproducteurs <sup>160</sup>).

## 1.2°) Biosynthèse, concentrations physiologique et pathologique

L'adénosine est formée suite au catabolisme des nucléotides adénine, au niveau intra- et extracellulaire dans le cœur. Il existe 2 voies de synthèse : une première voie par hydrolyse de la S-adénylhomocystéine en homocystéine et adénosine <sup>161</sup>, majoritaire en conditions physiologiques normales <sup>162</sup>; une seconde voie par déphosphorylation de l'adénosine monophosphate, majoritaire en conditions ischémiques/inflammatoires par rapport à la première voie <sup>163, 164</sup>. Les 2 voies de biosynthèse de l'adénosine sont présentées **Figure 10**.



**Figure 10 :** voies de biosynthèse et de transport de l'adénosine endogène et exogène et principales enzymes impliquées

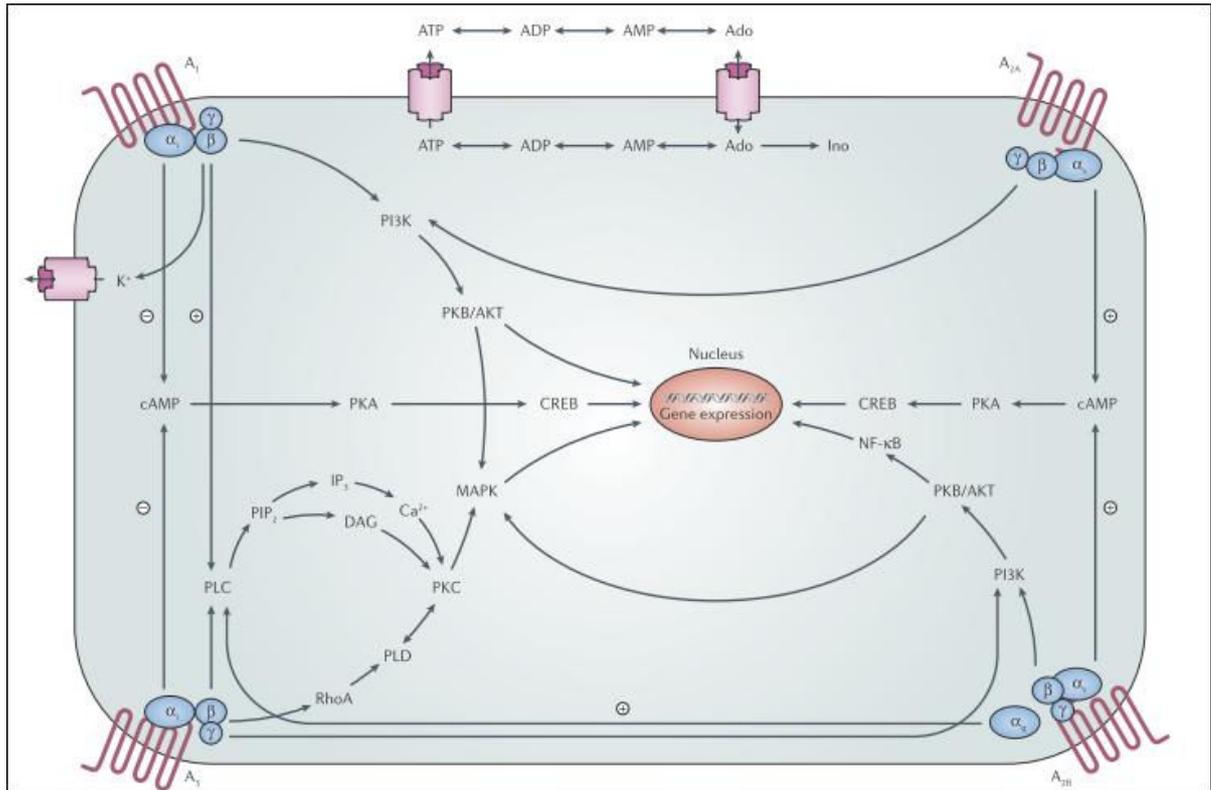
*L'adénosine est synthétisée à partir de l'hydrolyse de la S-adénylhomocystéine ou à partir de l'hydrolyse de l'ATP. AMP Adénosine MonoPhosphate ADP Adénosine Diphosphate ATP Adénosine TriPhosphate cAMP Adénosine MonoPhosphate cyclique ENT Equilibrative Nucleoside Transporter SAH S-AdénylHomocystéine*

La concentration extracellulaire d'adénosine est de l'ordre de 30 à 300nM dans les fluides biologiques en conditions physiologiques <sup>165</sup>. En revanche, lors d'un stress tel qu'un évènement ischémique, une inflammation, elle peut atteindre une concentration supérieure ou égale à 10µM <sup>14, 165, 166</sup>. Cette augmentation de la concentration extracellulaire est due à l'augmentation de la consommation d'ATP, à l'inhibition de l'adénosine kinase, à l'hydrolyse des nucléotides adénine par les 5'ectonucléotidases extracellulaires ou au transport exogène massif de l'adénosine endogène par les transporteurs ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) en réponse à des dommages cellulaires.

## 2°) Récepteurs à l'adénosine

### 2.1°) Structure et voies d'activation

L'adénosine peut se fixer sur quatre types de récepteurs transmembranaires : A1, A2A, A2B et A3. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G (G-protein coupled receptors). Ce sont des récepteurs à 7 hélices transmembranaires et chaque récepteur a sa spécificité cellulaire et tissulaire et active des cascades de signalisation différentes <sup>13</sup> (**Figure 11**) mais il est admis que les voies finales sont classiques (MAPK, NFκB, CREB) et que les conséquences intracellulaires varient avec les types de cellules, leur degré d'activation et l'environnement.



**Figure 11 :** voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs à l'adénosine (d'après Jacobson, 2006 <sup>13</sup>)

*CREB cAMP response element binding protein DAG diacylglycerol IP3 inositol 1,4,5-triphosphate PI3K phosphatidylinositol 3-kinase PIP2 phosphatidylinositol-4,5-biphosphate PK protein kinase PLC phospholipase C PLD phospholipase D NFκB nuclear factor-κB*

Les types A1 et A3 présentent 49% d'homologie de séquence, les types A2A et A2B présentent 59% d'homologie de séquence <sup>13</sup>. La classification initiale des récepteurs à l'adénosine a été faite selon leur mode d'action sur l'adénylate cyclase (synthèse de cAMP). A1 et A3 sont des inhibiteurs de l'adénylate cyclase (récepteurs à protéine Gi), tandis que A2A et A2B sont des activateurs de l'adénylate cyclase (récepteurs à protéine Gs). La nomenclature actuelle est basée sur leur séquence en acides aminées <sup>155, 167</sup>. Les récepteurs à l'adénosine sont aujourd'hui très bien caractérisés tant au niveau structural que pharmacologique <sup>167</sup>.

Les récepteurs à l'adénosine sont relativement ubiquitaires, néanmoins leur distribution primaire est présentée **Tableau 7**, ainsi que le mécanisme de transduction employé et quelques exemples de fonction tissulaire.

**Tableau 7 :** mécanismes de transduction, distribution tissulaire/cellulaire et fonction tissulaire/cellulaire des récepteurs à l'adénosine

Récepteur	A1	A2A	A2B	A3
<b>Mécanisme de transduction</b>	↓ adénylate cyclase (↓ cAMP)	↑ adénylate cyclase (↑ cAMP)	↑ adénylate cyclase (↑ cAMP)	↓ adénylate cyclase (↓ cAMP)
<b>Protéine G associée</b>	Gi/o	Gs	Gs	Gi/o
<b>Distribution tissulaire/cellulaire</b>	Cerveau, œil, estomac, cœur, rate, vessie, reins, foie, tissu adipeux	Rate, thymus, leucocytes, thrombocytes, neurones, bulbe olfactif, cœur	Ubiquitaire	Mastocytes, testicules, cœur, poumons
<b>Fonction tissulaire/cellulaire</b>	Sédation, inhibition de la lipolyse, hypothermie, cardioprotection, neuroprotection, analgésie, sommeil	Tachycardie, vasodilatation, antiagrégation plaquettaire, protection contre l'ischémie	Relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires et intestinales, production de cytokines, inhibition de la prolifération cellulaire	Dégranulation mastocytaire, vasodilatation coronaire, protection contre la reperfusion

## 2.2°) Ligands

Tous les récepteurs sont évidemment capables de lier l'adénosine, cependant leurs affinités sont très différentes. Il est admis que les récepteurs de type A1 et A2A sont de haute affinité, tandis que les types A2B et A3 sont de basse affinité pour l'adénosine. D'autres ligands sont capables de se lier à ces récepteurs et nous disposons à l'heure actuelle d'un vaste choix d'agonistes et d'antagonistes de ces récepteurs<sup>13, 167</sup>. Cependant, les constantes d'affinité respectives des récepteurs pour des ligands réduisent les possibilités de caractérisation des effets des récepteurs de basse affinité A2B et A3 lorsque plusieurs récepteurs sont exprimés par le même type cellulaire<sup>165</sup>.

Nous pouvons également mentionner l'antagoniste non spécifique des récepteurs à l'adénosine le plus connu car il représente la « drogue » la plus consommée mondialement de nos jours : la caféine, appartenant à la famille des

xanthines. Une liste non exhaustive d'agonistes et d'antagonistes de l'adénosine est présentée **Tableau 8** avec les constantes d'inhibition pour chaque type de récepteur.

**Tableau 8 :** agonistes et antagonistes des récepteurs à l'adénosine avec constante d'inhibition (d'après Fredholm, 2011 <sup>167</sup>)

composés		Constante d'inhibition Ki (nM)			
		A1	A2A	A2B	A3
agoniste	Adenosine	100	310	15000	290
	CGS 21680	290	27	88800	67
	CCPA	0.8	2300	18800	42
	2-Cl-IB-MECA	820 (rat)	470 (rat)	-	0.33 (rat)
	CPA	2.3	790	18600	43
	IB-MECA	3.7	2500	11000	1.2
	NECA	14	20	2400	6.2
antagoniste	caféine	10700	23400	33800	13300
	theophylline	6770	1710	9070	22300
	DPCPX	3.9	130	50	4000
	MRS1220	305 (rat)	52 (rat)	-	0.7
	MRS1754	403	503	1.97	570
	ZM241,385	540	1.4	31	270
	SCH 58261	419	1.3	69	130

### 3°) Potentiel thérapeutique

#### 3.1°) Effets sur la fonction cardiaque

Le potentiel thérapeutique de l'adénosine et de ses récepteurs a fait l'objet de nombreuses études, au moyen d'agents pharmacologiques et d'animaux transgéniques. Les mécanismes physiologiques et pathologiques dans lesquels l'un ou l'autre, voire plusieurs récepteurs à l'adénosine sont impliqués sont nombreux.

L'adénosine est une molécule dont la demi-vie dans le milieu extracellulaire est très faible, de l'ordre de quelques secondes. Sa fonction principale est la cytoprotection <sup>13, 168</sup>. Cette cytoprotection s'applique à 4 niveaux : augmentation du rapport entre apport d'oxygène et consommation, protection contre les dommages ischémiques par conditionnement, activation des mécanismes anti-inflammatoires, promotion de l'angiogénèse <sup>169</sup>. Ce large spectre d'actions fait de l'adénosine une cible thérapeutique de premier ordre, notamment dans les pathologies cardiovasculaires. Les mécanismes d'action de l'adénosine extracellulaire passent par

l'activation de ses 4 récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles, A1, A2A, A2B et A3.

Les cellules musculaires lisses vasculaires des artères coronaires expriment fortement le récepteur à l'adénosine A2A. L'adénosine extracellulaire provoque une vasodilatation en augmentant l'approvisionnement en oxygène dans le cœur ischémié<sup>170</sup>. Les vaisseaux sanguins des autres tissus sont également sensibles à l'adénosine, mais dans une moindre mesure que les artères coronaires, et se dilatent après exposition à l'adénosine *via* une activation des récepteurs A2A et A2B.

L'adénosine est également impliquée dans la réduction des dommages causés par l'ischémie/reperfusion<sup>171</sup>. Le pré-conditionnement ischémiq ue est une technique expérimentale basée sur le postulat qu'un organe soumis à une ou une succession de brève(s) période(s) d'ischémie répond plus favorablement à une ischémie prolongée. Il a été montré que l'adénosine protège le tissu cardiaque lors du pré-conditionnement ischémiq ue *via* une activation des récepteurs A1 et A3 des cellules du tissu cardiaque<sup>172</sup>. Le post-conditionnement ischémiq ue correspond à l'application d'une brève période ischémiq ue consécutivement à une ischémie prolongée. Le post-conditionnement ischémiq ue réduit la taille de l'infarctus et diminue l'inflammation due à la reperfusion du myocarde chez le chien<sup>173</sup>. Cet effet passe vraisemblablement par une inhibition de l'inflammation induite par l'activation du récepteur A2A présent à la surface des cellules inflammatoires.

Les propriétés anti-inflammatoires de l'adénosine sont connues, elle est capable de réduire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la génération de ROS et l'expression de molécules d'adhésion par les neutrophiles *via* une activation du récepteur A2A<sup>174, 175</sup>. Cette réduction de l'inflammation passe également par une diminution de l'infiltration des neutrophiles dans le tissu lésé.

L'administration intracoronarienne d'adénosine lors de la reperfusion préserve la structure de l'endothélium cardiaque, atténue l'infiltration des neutrophiles, améliore la fonction ventriculaire et réduit la taille de l'infarctus chez le chien<sup>176</sup>. L'adénosine est également capable d'agir sur le remodelage myocardique précoce probablement par une diminution de l'infiltration des neutrophiles dans le tissu lésé *via* une inhibition de l'expression de MMP-9 induite par le récepteur A2A<sup>16</sup>.

L'adénosine agit également sur les macrophages (seconde vague de cellules inflammatoires dans le myocarde post-IM). Les macrophages expriment les 4 types de récepteurs à l'adénosine. La stimulation du récepteur A2A conduit à une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires induite par une stimulation de TLR4<sup>177</sup> et augmente la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10). Les effets de l'adénosine sur la voie TLR4 sont connus mais non caractérisés au niveau moléculaire à l'heure actuelle.

Un autre rôle de l'adénosine est de promouvoir l'angiogénèse en augmentant l'expression de médiateurs pro-angiogéniques et en diminuant l'expression des médiateurs pro-inflammatoires chez le macrophage activé<sup>20, 178, 179</sup>, un mécanisme appelé switch angiogénique<sup>180, 181</sup>. La néovascularisation d'une zone infarctée étant un enjeu majeur pour la guérison d'un IM et pour prévenir une IC.

L'adénosine permet également de réduire l'hypertrophie cardiaque, par une action sur l'organisation des microtubules des cardiomyocytes<sup>182</sup>. Lu et collaborateurs ont mis en évidence dans un modèle de constriction aortique transversale chez la souris, que la stimulation du récepteur à l'adénosine A1 réduit l'hypertrophie cardiaque et la dysfonction ventriculaire, en revanche la stimulation du récepteur à l'adénosine A3 augmente la dysfonction ventriculaire et l'hypertrophie<sup>183</sup>. Cette dichotomie est liée à l'affinité des récepteurs A1 et A3 pour l'adénosine (haute *versus* basse).

Toutes ces constatations font de l'adénosine une molécule de choix pour le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires.

### **3.2°) Essais cliniques**

L'adénosine est depuis longtemps administrée pour diminuer le rythme cardiaque dans les cas de tachycardie supraventriculaire<sup>167</sup>.

Une étude clinique est en cours pour déterminer si l'administration d'adénosine en intracoronaire juste avant la reperfusion avec pose d'un stent peut

avoir une incidence sur la nécrose myocardique au suivi médical à 30 jours (étude *Prophylactic intracoronary adenosine to prevent postcoronary artery stenting myonecrosis*, identifiant clinicaltrials.gov NCT00612521, Ottawa Heart Institute). Une autre étude vise à déterminer si l'administration d'adénosine en intracoronaire peut préserver l'intégrité microvasculaire du myocarde après IM (étude *Salvage : postconditioning with adenosine for STEMI*, identifiant clinicaltrials.gov NCT00284323, University Hospital, Gasthuisberg). L'étude PROMISE (*Myocardial Protection with adenosine during PTCA in patients with STEMI*, identifiant clinicaltrials.gov NCT 00781404, Hospital Universitari Vall d'Hebron) étudie les effets d'une infusion d'adénosine intracoronarienne au moment de la reperfusion sur la taille de l'infarctus et la limitation du remodelage du ventricule gauche chez des patients souffrant de syndromes coronaires aigus.

L'étude clinique AMISTAD (*Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine*, 2005), a révélé que l'administration intraveineuse d'adénosine à des patients ayant subi un infarctus du myocarde lors de la reperfusion (thrombolyse ou angioplastie coronarienne) réduit légèrement la taille de l'infarctus, cependant il n'y a pas de différences significatives sur le pronostic entre le groupe placebo et le groupe adénosine <sup>184</sup>. En revanche, l'étude AMISTAD II (2006), focalisée sur le temps d'ajout d'adénosine lors de la reperfusion (moins de 3 heures après la reperfusion) a révélé un meilleur pronostic avec une baisse de la mortalité et de la prévalence de l'insuffisance cardiaque à 6 mois <sup>185</sup>.

D'autres approches cliniques consistent à employer des inhibiteurs des transporteurs d'adénosine afin de maintenir une forte concentration extracellulaire en augmentant la demi-vie de la molécule. Le dipyridamole (DIP) est un inhibiteur des transporteurs ENT et est utilisé actuellement dans une étude visant à mesurer son effet sur la vasodilatation coronaire (*Normal coronary artery with slow flow improved by adenosine injection, dipyridamole treatment, and clinical follow-up*, clinicaltrials.gov identifiant NCT00960817).

L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des récepteurs à l'adénosine fait également l'objet de nombreuses études cliniques, notamment dans le contexte des maladies cardiovasculaires <sup>167</sup>. Quelques exemples sont présentés dans le

**Tableau 9.**

**Tableau 9 :** exemples d'études cliniques réalisées à l'aide d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine, les détails des études sont consultables sur [clinicaltrials.org](http://clinicaltrials.org) à l'aide des identifiants mentionnés.

	<b>Composé</b>	<b>But</b>	<b>Effet</b>	<b>A l'initiative de / statut</b>	<b>Identifiant NCT</b>
<b>agoniste</b>	<b>Récepteur A1</b> <i>Capadenoson</i>	Réduire le rythme cardiaque chez les patients présentant une fibrillation auriculaire	Non publié	Bayer Schering Pharma, Allemagne / terminée 2011	NCT00568945
	<b>Récepteur A2A</b> <i>Regadenoson</i> <sup>186, 187</sup>	Vasodilatation pour faciliter l'imagerie myocardique par perfusion	<i>Regadenoson</i> possède la même efficacité que l'adénosine mais est mieux toléré par les patients	Gilead Sciences, USA / Terminée 2009	NCT00208312
<b>antagoniste</b>	<b>Non spécifique</b> <i>Caféine</i> <sup>188</sup>	Effets sur le pré-conditionnement ischémique	Supprime le pré-conditionnement ischémique	Radboud University, Pays-Bas / terminée 2008	NCT00184912
	<b>Récepteur A1</b> <i>Rolofylline</i> <sup>189-191</sup>	Insuffisance cardiaque aiguë avec dysfonction rénale	N'améliore pas le pronostic	NovaCardia, Merck, USA / terminée 2008, mise à jour 2011	NCT00354458

## Chapitre 4 : recherche de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires

Un biomarqueur médical est une molécule/un paramètre dont la concentration et/ou la conformation et/ou la valeur subit des variations suite à un état pathologique. Le biomarqueur doit être accessible rapidement et facilement (*via* la circulation sanguine ou les fluides corporels pour une molécule par exemple). Par souci de clarté, l'appellation « biomarqueur » sera employée exclusivement pour les molécules biochimiques dans ce manuscrit.

Un biomarqueur doit permettre le tri des patients souffrant de douleurs à la poitrine lors de l'hospitalisation, c'est donc un outil diagnostique qui permet d'identifier une pathologie telle que l'infarctus du myocarde.

Un biomarqueur doit améliorer la prédiction d'un remodelage du ventricule gauche et de la dysfonction myocardique, c'est donc un outil pronostique, qui doit permettre d'évaluer l'évolution d'une pathologie et d'adapter les stratégies thérapeutiques.

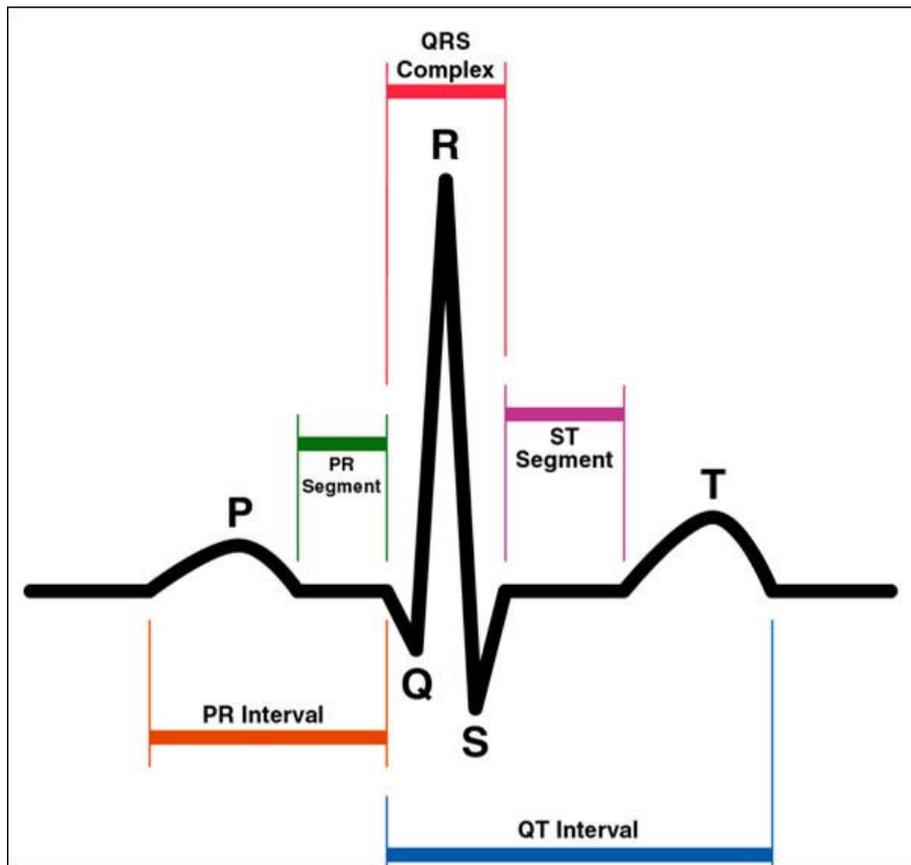
### 1°) Diagnostic de l'infarctus du myocarde

Lorsque les patients se présentent à l'hospitalisation avec une douleur à la poitrine (angor), les médecins suspectent en premier lieu un infarctus du myocarde<sup>192, 193</sup>. Le diagnostic doit être rapidement établi afin de mettre en place le traitement adapté<sup>194, 195</sup>.

Actuellement, 2 paramètres sont utilisés pour diagnostiquer un infarctus du myocarde<sup>192-195</sup> : l'électrocardiographie et la mesure biochimique des troponines cardiaques et/ou de la créatine phosphokinase. Ces indicateurs ne sont pas spécifiques à 100% et bénéficieraient de la découverte de nouveaux biomarqueurs.

#### 1.1°) L'électrocardiographie

L'électrocardiographie est une méthode de mesure du potentiel électrique cardiaque, qui reflète l'activité musculaire du cœur. Elle est représentée graphiquement sous forme d'un tracé électrique, l'électrocardiogramme (ECG), dont un exemple est représenté **Figure 12** avec explication des différents paramètres.



**Figure 12 :** représentation d'un électrocardiogramme normal  
(source : [wikipedia.org/wiki/électrocardiogramme](http://wikipedia.org/wiki/électrocardiogramme))

*L'onde P correspond à la contraction des atria, le complexe QRS correspond à la contraction des ventricules et l'onde T correspond à la relaxation des ventricules. L'intervalle PR correspond au temps de transmission électrique des atria aux ventricules (conduction auriculo-ventriculaire), l'intervalle QT reflète le temps de systole ventriculaire (contraction-relaxation) et le segment ST correspond au temps de relaxation ventriculaire.*

La modification de certains paramètres de l'ECG, comme par exemple une élévation du segment ST, indique une ischémie myocardique. Cependant, ces paramètres sont insuffisants pour indiquer à 100% qu'il s'agit d'un infarctus du myocarde, et une modification de certains de ces paramètres est parfois observée dans d'autres pathologies cardiovasculaires comme les péricardites aiguës ou l'hypertrophie ventriculaire <sup>196</sup>.

## 1.2°) Troponines cardiaques

Les troponines sont des protéines de structure des muscles squelettiques. Les isoformes I et T sont spécifiques du muscle cardiaque. La troponine I a pour fonction cellulaire l'inhibition de la liaison entre la myosine et l'actine, ce qui conduit à la relaxation musculaire. La troponine T se lie à la tropomyosine qui sert à stabiliser les filaments d'actine. Ce sont des protéines de localisation strictement intracellulaire. Lors d'une ischémie myocardique conduisant à un infarctus du myocarde, les cellules du tissu cardiaque meurent par nécrose, ce qui relarguent les troponines dans la circulation sanguine où elles deviennent détectables par dosage immunoenzymatique. Ce sont donc des marqueurs de l'agression des cardiomyocytes <sup>197-199</sup>.

Elles sont détectables relativement rapidement, à peine 2 heures après la manifestation de l'angor <sup>199, 200</sup> et sont très efficaces pour diagnostiquer l'infarctus du myocarde. Néanmoins, elles ne sont pas spécifiques de cette pathologie, elles reflètent uniquement l'agression cardiomyocytaire. Les cardiomyocytes peuvent être agressés suite à une chirurgie cardiaque sans aucun rapport avec un infarctus, dans l'insuffisance cardiaque <sup>201</sup>, avec le vieillissement <sup>202</sup>.

## 1.3°) Créatine phosphokinase

La créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme dont la fonction est de catalyser la conversion de la créatine en phosphocréatine. Elle peut être mitochondriale, dans ce cas, la conversion s'accompagne de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. La molécule d'ADP formée est ensuite transformée en ATP par la CPK cytosolique. Dans les cellules musculaires (cardiomyocytes par exemple), lors de la contraction, le taux d'ADP augmente fortement, alors que l'ATP diminue, la CPK catalyse alors la réaction inverse (déphosphorylation de la phosphocréatine en créatine), ce qui régénère le stock d'ATP.

En médecine de laboratoire, la mesure de l'activité de la CPK constitue un indicateur diagnostique de l'IM et plus particulièrement des dommages myocardiques. En effet, la CPK est libérée dans le sang suite à la nécrose des cardiomyocytes. Elle est détectable, au plus tôt, 4 heures après l'IM (*versus* 2 heures pour les TnT). De nos jours, son usage tant à être supplanté par celui des troponines cardiaques.

## **2°) Biomarqueurs pronostiques de l'insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque étant une des issues possibles suite à un infarctus du myocarde et à un remodelage du ventricule gauche, il est aujourd'hui nécessaire de pouvoir établir de manière précise son pronostic. Actuellement, plusieurs biomarqueurs biochimiques de l'IC sont utilisés, ils peuvent être classés en 6 catégories <sup>201</sup> : inflammation, stress oxydant, remodelage matriciel, neurohormones, dommages myocytaires et stress myocytaire.

### **2.1°) Biomarqueurs de l'inflammation**

La mise en place d'une IC est souvent liée à la présence de phases inflammatoires et plusieurs médiateurs de l'inflammation sont actuellement étudiés afin d'élucider les mécanismes de l'IC, d'améliorer le pronostic et d'identifier les patients à risques.

Parmi ces médiateurs se trouve la protéine C-réactive (CRP), protéine de phase aiguë, synthétisée par les hépatocytes en réponse à une stimulation pro-inflammatoire. La CRP est un prédicteur d'une issue médicale défavorable dans le cadre d'une IC aiguë ou chronique <sup>203</sup> mais manque de spécificité car elle est augmentée en cas d'infection, de tabagisme, etc.

Les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1, -6 et -18 sont produites par les cellules cardiaques en réponse à un stress, activent l'immunité innée et ont des effets indésirables sur la fonction ventriculaire gauche, ce qui tend à promouvoir la progression de l'insuffisance cardiaque <sup>120, 204</sup>.

La protéine Fas est une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs au TNF- $\alpha$ , exprimée à la surface des myocytes. C'est un médiateur de l'apoptose des cardiomyocytes. Les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont des niveaux sériques élevés de la forme soluble de Fas <sup>205</sup>.

### **2.2°) Biomarqueurs du stress oxydant**

Le stress oxydant est la résultante d'un déséquilibre physiologique entre la synthèse de ROS et l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants. Les ROS

affectent la fonction endothéliale, provoquent l'apoptose et la nécrose des cardiomyocytes et contribuent au développement et à la progression de l'insuffisance cardiaque<sup>206</sup>.

Les ROS ne sont pas directement mesurables en routine, ce sont leurs cibles qui sont mesurées : lipoprotéines de faible densité oxydées plasmatiques (oxLDL), malondialdéhyde, myeloperoxydase, taux de biopyrrines urinaires (métabolites de la bilirubine), niveaux plasmatiques et urinaires d'isoprostanes.

Les niveaux de myeloperoxydase et d'isoprostanes sont corrélés à la sévérité de l'insuffisance cardiaque et sont des prédicteurs de la mortalité après IC<sup>207</sup>. Il est à noter que le taux d'isoprostane plasmatique corrèle positivement avec l'activation des MMPs, notamment MMP-9 et MMP-2, ce qui exacerbe le remodelage du ventricule gauche délétère et accélère l'apparition de l'insuffisance cardiaque<sup>207</sup>.

### **2.3°) Biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque**

Le remodelage du ventricule gauche est un processus clé dans le développement de l'insuffisance cardiaque<sup>75</sup>. Le déséquilibre entre renouvellement et dégradation de la MEC, mécanismes principalement contrôlés par les MMPs et les TIMPs, entraîne l'apparition d'une insuffisance cardiaque. La MMP-9 a été identifiée comme un biomarqueur pronostic du remodelage ventriculaire délétère conduisant à l'insuffisance cardiaque<sup>22, 24, 25</sup>.

Les propeptides de collagène I et III<sup>208</sup> sont également impliqués dans le développement d'une insuffisance cardiaque<sup>209, 210</sup>.

### **2.4°) Biomarqueurs neurohormonaux**

L'apparition d'une insuffisance cardiaque est liée à l'activation du système nerveux sympathique. Les médiateurs neurohormonaux impliqués sont : la norépinephrine<sup>211</sup>, le système rénine-angiotensine-aldostérone<sup>212, 213</sup>, l'arginine vasopressine et l'endothéline<sup>201, 210</sup>.

La copeptine, fragment C-terminal de la pro-hormone arginine vasopressine est à l'étude en tant que biomarqueur de l'IC post-IM<sup>214</sup>. L'arginine vasopressine est une hormone de stress endogène dont l'expression est augmentée en cas de baisse de

la pression artérielle. L'arginine vasopressine contribue à la dysfonction ventriculaire et au remodelage myocardique, ce qui conduit à l'IC <sup>215</sup>. La mesure plasmatique de copeptine est plus aisée que la mesure de l'arginine vasopressine. En effet, la copeptine possède une demi-vie plasmatique plus longue et reflète la production d'arginine vasopressine puisqu'elle est synthétisée de façon stœchiométrique 1 :1 avec l'arginine vasopressine <sup>214</sup>. Khan *et coll.* ont montré en 2007, dans une étude clinique réalisée sur 980 patients souffrant d'un IM, que la copeptine est un prédicteur de la survenue d'une IC post-IM <sup>216</sup>.

### 2.5°) Biomarqueurs des dommages myocardiques

Les troponines T et I peuvent être considérées comme biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque, bien qu'elles présentent une faible valeur pronostique. Il est à mentionner que les troponines I sont détectables chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque sans dommages ischémiques <sup>217</sup>, et que les troponines T sont des indicateurs de mortalité post insuffisance cardiaque <sup>218</sup>.

Les protéines myocardiques MLC1 (Myosin Light Chain 1), FABP (Fatty-Acid Binding Protein) et l'isoenzyme créatine phosphokinase-MB sont également des indicateurs pronostiques de l'insuffisance cardiaque et des prédicteurs de la mortalité <sup>219</sup>.

### 2.6°) Biomarqueurs du stress myocardique

Plusieurs biomarqueurs du stress myocardique sont décrits et utilisés, parmi eux les peptides natriuretiques et plus particulièrement le BNP (actif) et son métabolite secondaire (inactif) le NT-pro-BNP.

Le précurseur pro-BNP est synthétisé par les cardiomyocytes puis secrété et clivé en BNP et NT-pro-BNP par une endoprotéase circulante, la corine. La sécrétion a lieu en réponse à un stress hémodynamique, c'est-à-dire lorsque les ventricules sont dilatés, hypertrophiés, ou distendus <sup>220</sup>. Le BNP possède plusieurs fonctions : il provoque une vasodilatation artérielle, il augmente la sécrétion de sodium par les reins et possède un effet diurétique, il réduit l'activation du système rénine-angiotensine-

aldostérone et du système nerveux sympathique <sup>221, 222</sup>. Ces fonctions font normalement du BNP un modulateur négatif de l'insuffisance cardiaque.

L'élimination du BNP et du NT-pro-BNP se fait au niveau des reins. Cependant, en cas d'insuffisance rénale (le patient développe des complications cardiovasculaires comme une hypertrophie cardiaque), la concentration plasmatique des peptides natriurétiques est augmentée <sup>223</sup>. L'âge est également un facteur d'augmentation des niveaux sanguins de BNP, dû à la fibrose cardiaque et à l'insuffisance rénale <sup>224</sup>. Les peptides natriurétiques sont à l'heure actuelle les biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque les plus employés <sup>224</sup>, mais leur interprétation reste délicate, notamment chez les sujets âgés et insuffisants rénaux.

La dyspnée (difficulté respiratoire) est un symptôme fréquent chez les insuffisants cardiaques. Dans ce cas précis, le BNP et le NT-pro-BNP ont démontré une certaine efficacité pour évaluer la présence d'une insuffisance cardiaque <sup>225, 226</sup>. Cependant, l'interprétation des résultats, par exemple pour déterminer s'il s'agit d'une insuffisance cardiaque aiguë ou chronique, est soumise à précaution.

Une étude clinique a montré une forte corrélation entre les niveaux de BNP à l'hospitalisation et la mortalité due à l'insuffisance cardiaque aiguë <sup>227</sup>. Une autre étude a montré que cibler une réduction du taux sanguin de BNP (traitements par  $\beta$ -bloquants et IEC) réduit la mortalité des patients insuffisants cardiaques <sup>228</sup> (diagnostic établi avec la classification NYHA). Les peptides natriurétiques sont des indicateurs diagnostiques et pronostiques de l'insuffisance cardiaque et font toujours l'objet d'intenses recherches <sup>222</sup>.

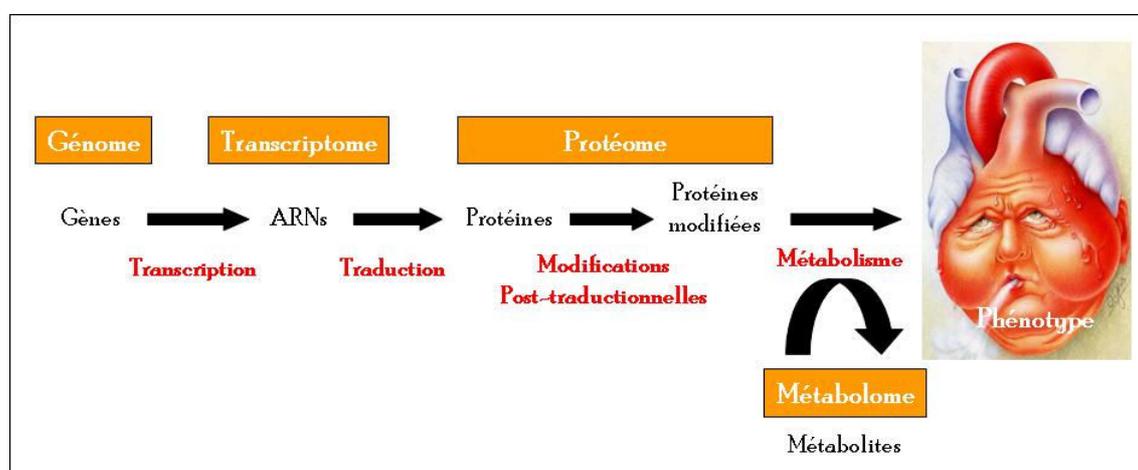
D'autres médiateurs du stress myocardique sont également à l'étude et/ou proposés comme biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque : l'adrénomédulline et la protéine ST2 (qui appartient à la famille des récepteurs à l'IL-1). Ces 2 protéines sont présentes dans le tissu cardiaque stressé et des niveaux sanguins élevés semblent corrélés avec l'insuffisance cardiaque, de la même façon que les peptides natriurétiques <sup>229-232</sup>.

## 2.7°) Bilan

De nombreux biomarqueurs pronostiques potentiels de l'insuffisance cardiaque sont à l'étude, mais étant donné la nature complexe de l'insuffisance cardiaque, la multitude de symptômes et de traitements existants, il apparaît évident que le panel existant doit être renforcé.

## 3°) Nouvelles stratégies pour l'identification de biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque

La plupart des biomarqueurs disponibles ont été identifiés par des études ciblées sur des voies biologiques connues, telles que l'inflammation par exemple. Des nouvelles approches à haut débit tendent à caractériser l'expression des gènes, des ARN, des protéines et des métabolites associés à une pathologie dans sa globalité, une représentation de la démarche actuelle est présentée **Figure 13**.



**Figure 13 :** concept actuel pour la recherche de biomarqueurs incluant un lien entre étude du génome, du transcriptome, du protéome et du métabolome (inspiré de Gerszten *et coll.* 2008<sup>233</sup>)

### 3.1°) Génomique et transcriptomique

Depuis l'achèvement du séquençage du génome humain en 2001<sup>234</sup>, une nouvelle ère dans le diagnostic et le pronostic des pathologies (cardiovasculaires) s'est ouverte. La génomique est une discipline étudiant le fonctionnement d'un organisme, d'une pathologie, à l'échelle du génome. Nous pouvons différencier la génomique structurale, dédiée au séquençage du génome, de la génomique fonctionnelle qui étudie la fonction et l'expression des gènes par caractérisation du transcriptome et du protéome. La transcriptomique représente l'étude des ARNm produits lors de la transcription du génome. Elle vise à quantifier l'expression des ARNm dans des conditions données et à identifier des protéines découlant de la transcription des ARNm impliquées dans le développement de la pathologie.

Les études génétiques actuelles sont focalisées sur la caractérisation d'un gène candidat et des polymorphismes nucléotidiques ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) et leurs associations avec la maladie. Des approches pangénomiques ont mis en évidence des nouvelles voies de signalisation associées avec le développement d'une insuffisance cardiaque<sup>235, 236</sup>. Des groupes de recherche ont identifié des *loci* chromosomiques impliqués dans le développement d'un infarctus du myocarde<sup>237, 238</sup>.

Les approches transcriptomiques sont plus délicates à mettre en œuvre vu qu'il faut disposer de tissus cardiaques ou de cellules sanguines. Néanmoins, une étude *in vitro* a permis d'identifier la protéine ST2 comme marqueur de l'insuffisance cardiaque d'après une augmentation de son ARNm observée chez le cardiomyocyte soumis à une contrainte mécanique<sup>239</sup>. Ces résultats ont été ensuite confirmés chez l'Homme par dosage sérique de ST2 chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque, un taux élevé de ST2 étant corrélé à un pronostic défavorable<sup>231</sup>. Une étude menée par Heideker et coll. en 2008 sur des biopsies endomyocardiques de patients a mis en évidence une régulation différentielle d'un groupe de 45 gènes pouvant prédire une insuffisance cardiaque<sup>240</sup>.

### 3.2°) Protéomique et métabolomique

La protéomique représente l'étude du protéome d'un organisme, à un moment donné et sous des conditions données. Il est possible d'étudier l'expression, la localisation, les modifications post-traductionnelles, la structure, la fonction et la quantité de protéines grâce à cette discipline. Le protéome présente plusieurs attraits. En premier lieu, les protéines sont les effecteurs principaux des fonctions cellulaires et histologiques. De plus, l'expression d'un ARNm ne signifie pas à coup sûr que cet ARNm sera traduit en protéine. Les protéines sont également régulées par des modifications post-traductionnelles (de type phosphorylation ou glycosylation pour ne citer que les plus fréquentes) afin d'être matures et fonctionnelles. Un autre critère en faveur de l'analyse protéomique est la localisation des protéines : selon le compartiment dans lequel elles se trouvent, leur fonction sera différente (exemple des facteurs de transcription qui transitent du cytoplasme vers le noyau).

L'étude d'un protéome présente certaines contraintes. Caractériser des biomarqueurs de maladies cardiovasculaires à partir de tissu cardiaque est une tâche ardue : le tissu cardiaque est extrêmement dynamique, sa composition cellulaire comprend de nombreux types cellulaires différents (cardiomyocytes, cellules endothéliales, etc.) et chacun de ces types cellulaires possède des sub-protéomes en fonction de son contenu en organelles par exemple <sup>241, 242</sup>. Une contrainte d'ordre plus pratique réside également dans la difficulté d'obtenir une biopsie cardiaque pour réaliser une étude protéomique. Un biomarqueur circulant est idéal, car détectable à partir d'une simple prise de sang <sup>243</sup>.

Dans ce contexte, la plupart des études protéomiques biomédicales sont initiées à partir de fluides biologiques et plus particulièrement de plasma. Le plasma est considéré comme la voie préférentielle pour la recherche de biomarqueurs <sup>244, 245</sup>. Le plasma est un fluide biologique facile à obtenir, très riche en protéines (de 60 à 80g/L), et soupçonné de contenir potentiellement plus de 300 000 protéines différentes <sup>192</sup>. En revanche, seules 22 protéines fortement exprimées constituent 99% de la concentration plasmatique (albumine, immunoglobulines G, haptoglobine, transferrine) <sup>192</sup>, ce qui peut représenter un obstacle à la découverte de biomarqueurs.

L'analyse protéomique a initialement débuté dans les années 70 grâce à l'invention de l'électrophorèse bidimensionnelle. Elle s'est poursuivie et se poursuit toujours à l'heure actuelle avec l'évolution de cette technique. Cependant, nous observons une diminution progressive des études faisant appel à l'électrophorèse 2D au profit de nouvelles techniques, telles que les approches dites « off-gel », la spectrométrie de masse (« shotgun proteomics <sup>246</sup> ») et les techniques de chromatographie à haut débit. Néanmoins, l'électrophorèse 2D demeure l'une des rares techniques protéomiques permettant de discriminer et quantifier efficacement des protéines selon leurs isoformes et leurs modifications post-traductionnelles <sup>247</sup>.

Citons deux exemples d'études protéomiques dans le domaine cardiovasculaire. Une étude protéomique a révélé l'implication de la MMP-12 dans l'installation d'un remodelage matriciel consécutif à un anévrisme aortique abdominal <sup>248</sup>. Une étude récente menée sur l'insuffisance cardiaque a mis en évidence une régulation différentielle de certaines protéines impliquées dans le métabolisme, la structure cardiaque et la réponse au stress <sup>249</sup>.

La métabolomique consiste à étudier l'ensemble des métabolites d'un organisme, d'un organe, ou d'un fluide. Un métabolite est une molécule de moins de 2kDa, telle que les lipides, sucres, ou acides aminés.

La métabolomique est une discipline récente. Le métabolome humain est à l'étude afin de constituer des bases de données utilisables pour des études biomédicales (Human Metabolome DataBase HMDB) <sup>250, 251</sup>. Les études métabolomiques sont essentiellement réalisées à partir de fluides biologiques (plasma, salive, urine) <sup>252</sup>. Le métabolome primaire contiendrait 3000 métabolites, les métabolomes secondaires plusieurs milliers encore non identifiés. Ces métabolites représentent des biomarqueurs potentiels, aussi bien diagnostiques que pronostiques, des pathologies telles que l'insuffisance cardiaque.

Deux techniques expérimentales sont actuellement employées pour caractériser le métabolome : la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La spectroscopie RMN est utilisée pour caractériser le métabolome à partir de sang, requiert peu d'étapes de

préparation de l'échantillon mais est moins sensible que la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est en général couplée avec un appareil de chromatographie liquide et permet d'étendre le champ de recherche à tous les fluides biologiques.

Les éléments mentionnés ci-dessus font de la protéomique et de la métabolomique des disciplines de choix pour l'étude de pathologies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque<sup>253</sup>. Ces nouvelles méthodes d'analyse représentent des moyens performants et stimulants pour la découverte de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de pathologies complexes telles que l'insuffisance cardiaque.

# **Matériel et Méthodes**

## Chapitre 1 : effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 et sur l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage

### 1°) Le registre LUCKY et les patients inclus dans l'étude TLR4

L'Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle Luxembourgeois (INCCI) a créé en 2006 un registre national appelé LUCKY. Ce registre est composé de patients souffrant d'un infarctus du myocarde aigu à leur arrivée aux urgences médicales et traités par angioplastie coronarienne ou pontage aorto-coronarien. Chaque patient inclus dans ce registre a signé un formulaire de consentement écrit en accord avec les directives du Comité de Bioéthique du Grand-duché du Luxembourg et conforme à la déclaration d'Helsinki. Ce registre comporte un certain nombre de paramètres morphologiques, cliniques et biochimiques reflétant l'état de santé des patients, ainsi qu'un suivi médical à 1 mois, 4 mois et 1 an post-infarctus.

Nous avons inclus dans cette étude 12 patients du registre LUCKY. Le diagnostic de l'infarctus du myocarde est établi par la présence d'une douleur thoracique moins de 12 heures après admission, une élévation significative du segment ST à l'électrocardiogramme et des enzymes cardiaques positives. Les prélèvements sanguins sont effectués lors de l'étape de reperfusion mécanique. Nous avons également inclus 12 volontaires sains.

L'activité de la CPK, ainsi que les taux de TnT et de protéine C réactive hyper-sensible (hsCRP), sont mesurés dans le sang des patients par le laboratoire de Biologie Médicale du Centre Hospitalier de Luxembourg. Les données démographiques et cliniques des 12 patients du registre LUCKY sont représentées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10 :** caractéristiques cliniques et démographiques des 12 patients souffrant d'infarctus du myocarde inclus dans l'étude TLR4

<b>Age, année (moyenne <math>\pm</math> SD)</b>	58	$\pm 18$
<b>Sexe masculin, n (%)</b>	11	92%
<b>Indice de Masse Corporelle (moyenne <math>\pm</math> SD)</b>	28	$\pm 4$
<b>Marqueurs plasmatiques (moyenne <math>\pm</math> SD)</b>		
<b>CPK (Unités/L)</b>	2672	2656
<b>TnT (ng/mL)</b>	3.9	3.8
<b>hsCRP (ng/mL)</b>	83	136
<b>Antécédents, n (%)</b>		
<b>Infarctus du myocarde</b>	3	25%
<b>Pontage aorto-coronarien</b>	2	17%
<b>Angioplastie coronarienne</b>	2	17%
<b>Diabète</b>	2	17%
<b>Hypertension</b>	3	25%
<b>Hypercholestérolémie</b>	6	50%
<b>Tabac</b>	5	42%
<b>Médicaments, n (%)</b>		
<b>Bêtabloquants</b>	9	75%
<b>Antagonistes du calcium</b>	3	25%
<b>Nitrates</b>	4	33%
<b>IEC</b>	2	17%
<b>Statines</b>	2	17%
<b>Inhibiteurs de l'angiotensine</b>	0	0%
<b>Numération Formule Sanguine, % (moyenne <math>\pm</math> SD)</b>		<b>Valeurs normales</b>
<b>Neutrophiles</b>	68.7 $\pm$ 22.2	40-74%
<b>Lymphocytes</b>	19.3 $\pm$ 15.7	19-48%
<b>Monocytes</b>	4.8 $\pm$ 2.0	3.4-9%
<b>Eosinophiles</b>	1.2 $\pm$ 1.5	0-7%
<b>Basophiles</b>	0.3 $\pm$ 0.3	0-1.5%

Tous les patients ont reçu de l'aspirine, de l'héparine, du clopidogrel et de l'abciximab. CPK : créatine phosphokinase ; hsCRP : protéine C réactive haute sensibilité ; IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; TnT : troponine T.

## 2°) Culture cellulaire

Les réactifs utilisés lors des expériences sont fournis par Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique) et tous les composants de culture cellulaire sont fournis par Lonza (Verviers, Belgique), sauf mention contraire.

Les cellules employées pour les expériences sont des macrophages primaires issus du sang de patients ayant subi un infarctus du myocarde ou de volontaires sains. Nous avons également employé la lignée cellulaire monocytoïde THP-1 (American Type Culture Collection, Middlesex, Royaume-Uni) qui provient d'un patient atteint de leucémie monocytaire aiguë, comme modèle d'étude macrophagique, en raison de la disponibilité de ces cellules, de leur temps de génération très court (environ 26 heures) et du faible coût de maintien en culture. Les conditions de culture de chaque type cellulaire employé seront détaillées dans les paragraphes correspondants.

La procédure de collecte des échantillons est réalisée de 3 façons différentes. En premier lieu, les milieux de culture sont prélevés, centrifugés, supplémentés en inhibiteurs de protéase (Roche, Mannheim, Allemagne) et en BSA à 0.2% en concentration finale, puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. En second lieu, les cellules sont collectées, soit dans du TriReagent™ pour en extraire ultérieurement l'ARN, soit dans du Cell Lysis Buffer (Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas) pour en extraire les protéines. Dans les 2 cas, les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les procédures d'extraction des ARNs et des protéines seront ultérieurement détaillées dans les sections correspondantes.

Afin d'évaluer la cytotoxicité des différents traitements employés, chaque réactif est vérifié à l'aide des tests de cytotoxicité suivants : Cytotoxicity Detection Kit (Roche) et test MTT (Sigma). Le Cytotoxicity Detection Kit mesure l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH) dans les milieux de culture cellulaire. Cette enzyme est exclusivement cytoplasmique et n'est présente dans le milieu extracellulaire que si l'intégrité membranaire des cellules est compromise.

Le test MTT mesure l'activité succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules. Le composé MTT hydrosoluble (bromure de tétrazolium 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl) est métabolisé par les cellules vivantes en un composé coloré insoluble dans l'eau, le formazan. Ce formazan est ensuite solubilisé dans un solvant, l'intensité de coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Tous les traitements employés lors de nos expériences ne sont pas cytotoxiques aux concentrations utilisées.

L'un des buts de ce travail étant d'étudier les effets de l'adénosine sur le récepteur aux endotoxines TLR4, nous avons contrôlé la présence d'endotoxine contaminante (lipopolysaccharide bactérien, LPS) dans chaque réactif et milieu de culture employé grâce au réactif E-Toxate® qui est un lysat d'améboocytes de *Limulus polyphemus* (LAL). La présence d'endotoxine fait instantanément gélifier le réactif. La limite de sensibilité de ce kit est de 0.05 unités d'endotoxine par mL. Chaque réactif et milieu de culture employé lors de nos expériences est exempt d'endotoxine.

## **2.1°) Culture de la lignée monocyttaire THP-1**

### **2.1.1°) Mise en culture**

Les cellules de la lignée pro-monocytaire THP-1 sont cultivées dans un milieu dit de propagation : RPMI 1640 supplémenté avec 2mM d'ultraglutamine, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de solution d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Eurobio, Paris, France). Durant l'amplification, le milieu de propagation est renouvelé tous les 2 jours. Lors des traitements, la concentration en SVF est réduite à 1% dans l'éventualité d'études sur la MMP-9 (enzyme présente dans le SVF, discriminée par dosage immuno-enzymatique mais pas par zymographie). La culture de ces cellules (propagation et traitement) est effectuée dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.1.2°) Traitements

### 2.1.2.1°) Etude MMP-9 – traitements, transfections, évaluation de la capacité migratoire

Les monocytes THP-1 sont pré-traités pendant 15 minutes avec différents réactifs tels que : adénosine (0.01 jusqu'à 100 $\mu$ M), EHNA (inhibiteur de la dégradation de l'adénosine par l'enzyme adénosine déaminase, 10 $\mu$ M), agonistes et antagonistes des récepteurs à l'adénosine (0.1 à 10 $\mu$ M). Les conditions contrôle sont réalisées par ajout de DMSO (solvant de certains réactifs) à volume égal, le cas échéant. Nous induisons ensuite la différenciation par ajout de 150nM de PMA pendant 24 heures.

Les macrophages THP-1 sont ensuite stimulés pendant 24 heures par 100ng/mL de LPS, 10<sup>-7</sup> M de fMLP, 10 $\mu$ g/mL de hyaluronan (HA) ou 10 $\mu$ g/mL d'héparane sulfate (HS). Nous avons également réalisé des cultures sous conditions hypoxiques à l'aide du système Gaspak (GasPak 100/GasPak-Pouch, avec dégagement de 15 % CO<sub>2</sub> en 24 heures, BD Biosciences, Erembodegem, Belgique).

Lors de cette étude, nous avons conduit un certain nombre de transfections transitoires à l'aide de siARNs. Ces petits ARNs possèdent la propriété de s'hybrider sur leurs séquences cibles d'ARNm et d'en inhiber la traduction en induisant leur dégradation. Nous avons utilisé une technique basée sur l'électroporation commercialisée par la compagnie Amaxa (Lonza), appelée nucléofection®. La nucléofection® est une technique d'électroporation douce permettant de maximiser l'entrée de matériel exogène (siARN, plasmide, etc.) dans la cellule tout en minimisant la mort cellulaire.

Brièvement, les monocytes THP-1 sont transfectés dans l'appareil Nucleofector® dans un tampon de transfection commercial (Nucleofector™ solution V) en présence de 1.4 $\mu$ g de siARN dirigé contre l'un ou l'autre des récepteurs à l'adénosine, en suivant les instructions du fournisseur. Nous réalisons une condition contrôle dans laquelle les cellules subissent un choc électrique en absence de siARN. 48 heures après transfection, les cellules sont prétraitées par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA (en réalisant les contrôles adaptés) puis différenciées 48 heures par ajout de 150nM de PMA. Le temps de transfection choisi correspond au temps après lequel l'extinction d'expression de la cible ARNm est maximale. Les siARNs

ciblant les récepteurs à l'adénosine (*Homo sapiens*) ont été fournis par QIAGEN et sont présentés **Tableau 11**.

**Tableau 11** : liste des siARNs utilisés pour les transfections transitoires sur cellules THP-1

Cible	siARN	Séquences
Récepteur à l'adénosine A2A	A2A	5'-CAGGAGTGTCTGATGATTCA-3'
Récepteur à l'adénosine A2B	A2B	5'-CACGTATCTAGCTAATATGTA-3'
Récepteur à l'adénosine A3	A3	5'-CCCTATCGTCTATGCCTATAA-3'

Afin d'évaluer la capacité migratoire des THP-1 vers un chimioattractant, nous avons réalisé des tests de migration en utilisant le système Transwell® (Corning, Bornem, Belgique) en plaques 24 puits (Corning). Le Transwell® est une chambre amovible dont le fond est parsemé de micropores de 5µm de diamètre. Nous avons recouvert ces micropores d'une solution de gélatine B (substrat de la MMP-9) à 2% pendant 2 heures à température ambiante. Dans la plaque 24 puits, nous introduisons une solution de Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1, Peprotech, Londres, Royaume-Uni) à 10ng/mL, ce qui aura pour effet d'attirer les cellules présentes dans le Transwell®.

Les monocytes THP-1 sont ensuite cultivées 24 heures en présence ou non de 10µM d'adénosine/EHNA puis stimulées ou non pendant 30 minutes à l'aide d'un inhibiteur synthétique (GM6001, 10nM ou 1µM) ou endogène (TIMP-1, 10ng/mL, R&D Systems™), de la MMP-9. Suite à ces traitements,  $7.5 \times 10^4$  cellules sont introduites dans chaque Transwell®, la migration est évaluée après 24 heures en récoltant les cellules qui ont traversé le Transwell®. Ces cellules sont lysées et incubées avec la sonde fluorescente spécifique de l'ADN CyQuant GR® (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) pendant 15 minutes en suivant les instructions du fournisseur. La fluorescence est lue avec le spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmBH, Offenbourg, Allemagne) calibré pour une excitation à 492nm et une émission à 520nm. L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules ayant traversé la couche de gélatine du Transwell®.

### **2.1.2.2°) Etude TLR4 - traitements**

Les monocytes THP-1 sont différenciés préalablement par 150nM de PMA pendant 24 heures avant d'être prétraités pendant 15 minutes par 10µM d'adénosine et 10µM d'EHNA. Les macrophages THP-1 sont ensuite stimulés ou non par l'ajout de 100ng/mL de LPS à différents temps de traitement (5 minutes à 48 heures) pour les expériences de cinétique, ou à 24 heures pour les expériences en point final. Les conditions contrôle sont réalisées par ajout de DMSO à volume égal (solvant de l'EHNA).

## **2.2°) Culture de macrophages primaires humains**

Les macrophages primaires humains que nous avons utilisés dans nos expériences proviennent de patients atteints d'infarctus du myocarde, de volontaires sains et de patients souffrant d'hémochromatose. Cette dernière catégorie de patients nous permet de travailler avec de grandes quantités de sang (jusqu'à 500mL) nécessaires pour des expériences nécessitant de grandes quantités de macrophages. Les patients atteints d'hémochromatose ont également signé un formulaire de consentement écrit en accord avec les directives du Comité de Bioéthique du Grand-duché du Luxembourg et conforme à la déclaration d'Helsinki.

### **2.2.1°) Isolement des monocytes primaires**

#### **2.2.1.1°) Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique**

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont isolées stérilement à partir de sang total par gradient de Ficoll (Lymphoprep, MP Biomedicals, France) en tubes Leucosep (Greiner, Wemmel, Belgique), ce système permet de séparer globules rouges et PBMC du plasma grâce à une membrane poreuse introduite dans le tube. Le Ficoll est placé sous la membrane par centrifugation 1 minute à 200 x g puis nous déposons 30mL de sang total avant de centrifuger à 400 x g pendant 30 minutes à température ambiante. Les PBMC se trouvent regroupés en anneau à l'interface du Ficoll et du plasma au-dessus de la membrane et sont collectés. Ensuite, ils sont lavés avec du PBS puis centrifugés 15 minutes à 200 x g à

15°C. Les culots sont dissociés dans du PBS sans calcium ni magnésium (Lonza) supplémenté avec 2mM d'EDTA (Sigma), puis centrifugés 15 minutes à 200 x g à 10°C. Les culots sont ensuite suspendus dans du PBS sans calcium ni magnésium avec 2mM d'EDTA et 0,5% de SVF. La quantité de PBMC est évaluée par numération en présence de bleu trypan (Sigma). Les cellules sont centrifugées 15 minutes à 200 x g à 10°C. Le culot est repris dans du PBS sans calcium ni magnésium avec 2mM d'EDTA et 0,5% de SVF pour sélectionner les monocytes, la suspension est conservée à 4°C.

#### 2.2.1.2°) Purification des monocytes par sélection négative

La purification des monocytes est réalisée de façon stérile grâce au kit de sélection magnétique indirecte Monocyte Isolation kit II (Miltenyi, Royaume-Uni). Les PBMC sont mis en présence de Fc Blocking Reagent qui empêche la fixation non spécifique des anticorps de sélection ajoutés ultérieurement par saturation des récepteurs Fc de surface des cellules. Puis nous ajoutons un mélange d'anticorps biotinylés spécifiques des types cellulaires à éliminer : anti-CD3 et anti-CD7 pour les lymphocytes T, anti-CD16 pour les neutrophiles, anti-CD19 pour les lymphocytes B, anti-CD56 pour les cellules NK, anti-CD 123 pour les cellules progénitrices, granulocytes et mégacaryocytes et glycophorine pour la rétention des globules rouges. Ensuite, nous ajoutons des microbilles magnétiques couplées à de l'antibiotine aux PBMC, le mélange est introduit dans une colonne magnétique fixée sur un aimant. Les monocytes qui ne sont pas marqués, seront progressivement élués lors de 3 lavages successifs au PBS sans calcium ni magnésium avec 2mM d'EDTA et 0,5% de SVF puis centrifugés 10 minutes à 300 x g à 4°C. Le culot est repris en milieu RPMI 1640 contenant 2mM d'ultraglutamine, supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de solution d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium, et 1% de SVF décomplémenté. La quantité de monocytes est évaluée par numération en présence de bleu trypan puis nous mettons les monocytes en culture, à la densité choisie pour l'expérience en cours, en milieu RPMI complet contenant 50ng/mL de Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF, Peprotech) qui permet la différenciation des monocytes en macrophages.

Nous contrôlons la pureté des monocytes isolés par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-CD14 (spécifique des monocytes, BD Biosciences).

Usuellement, la pureté est supérieure à 90%. La coloration au bleu trypan nous renseigne sur la viabilité cellulaire après purification, généralement de 98%.

### **2.2.2°) Obtention de macrophages primaires à partir des monocytes isolés**

Les monocytes purifiés sont ensemencés à concentration désirée pour les expériences en milieu RPMI complet additionné de 50ng/mL de M-CSF. La différenciation des monocytes en macrophages s'effectue sur au moins 7 jours en renouvelant une partie du milieu de culture tous les 2 jours.

### **2.2.3°) Traitements des macrophages primaires**

#### **2.2.3.1°) Cas de l'étude MMP-9**

Les macrophages obtenus après différenciation sont prétraités avec 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes en réalisant les contrôles adaptés, avant d'être stimulés ou non par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures.

#### **2.2.3.2°) Cas de l'étude TLR4**

Les macrophages obtenus après différenciation sont prétraités pendant 15 minutes avec différents réactifs tels que : adénosine (10 $\mu$ M), EHNA (10 $\mu$ M), agonistes et antagonistes des récepteurs à l'adénosine (0.1 à 10 $\mu$ M) en réalisant les contrôles adaptés, avant d'être stimulés ou non par 100ng/mL de LPS, 50 $\mu$ g/mL de HS ou 50 $\mu$ g/mL de HA pendant 24 heures pour les expériences en point final.

Nous avons mené des expériences cinétiques dans lesquelles les macrophages ont été prétraités ou non par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être stimulés ou non par du LPS à différents temps de traitements (1 minute jusqu'à 48 heures selon les expériences).

### **3°) Etude de l'expression des ARNm**

Toutes les manipulations réalisées sur les ARNm sont exécutées dans un espace de travail dépourvu de RNases et DNases.

#### **3.1°) Préparation des ARN totaux**

##### **3.1.1°) à partir de sang total**

Les ARN totaux sont extraits du sang total en utilisant le kit PAXgene® Blood RNA (PreAnalytiX™, Franklin Lakes, USA). Le sang (2.5mL) est prélevé avec les tubes PAXgene® Blood RNA, ces tubes sont conçus pour préserver les acides nucléiques et stopper l'expression des gènes, ce qui présente un intérêt lorsque l'on travaille avec des molécules aussi instables que les ARN. Les manipulations ont été réalisées en suivant les instructions du fournisseur.

Après prélèvement, le tube est centrifugé pour culoter les acides nucléiques. Après lavage, le culot de centrifugation est mis en présence de tampons conçus pour la purification des ARN, ainsi que de protéinase K pour dégrader toutes les protéines présentes dans l'échantillon. L'échantillon est ensuite passé sur colonne PAXgene® Shredder et centrifugé, ce qui va homogénéiser le lysat cellulaire. Le surnageant est collecté et traité à l'éthanol. Ce traitement permet ensuite de fixer les ARN contenus dans l'échantillon sur colonne de silice PAXgene® RNA par centrifugation. Plusieurs étapes de lavages, ainsi qu'un traitement à la DNase I élimineront les contaminants résiduels (protéines, ADN et sels). Les ARN sont ensuite élués à l'aide d'un tampon d'éluion puis purifiés et concentrés grâce au RNeasy Minelute Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur.

L'ARN extrait est dosé par spectrophotométrie UV-visible, grâce au Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, USA). La qualité des ARN est évaluée en utilisant l'appareil Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Diegem, Belgique). Cet appareil de micro-électrophorèse capillaire sur puce permet de contrôler la présence et l'intégrité des ARN grâce à un fluorochrome incorporé dans le gel de la puce. L'intensité de fluorescence est comparée à un marqueur standard.

### 3.1.2°) à partir de cellules en culture

Les ARN totaux sont extraits sur colonne de silice à l'aide du TriReagent™ (Sigma), qui les préserve des dégradations par les RNases, et du RNeasy Mini Kit (Qiagen), avec digestion à la DNase I (Qiagen), d'après les instructions du fournisseur.

Après avoir ajouté 200µL de chloroforme (Merck, Overijse, Belgique) par mL de Trireagent™, les tubes sont incubés à température ambiante 10 minutes puis centrifugés à 15 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Un volume équivalent d'éthanol 70% (Merck) est ajouté à la phase aqueuse et le mélange est déposé sur colonne RNeasy. Les ARN fixés sur la colonne sont lavés par 350µL de tampon RW1 riche en sels, puis incubés 15 minutes avec de la DNase I. Ils sont ensuite rincés par 350µL de tampon RW1 puis par 500µL de tampon RPE, afin d'éliminer les sels, protéines et contaminants d'après les instructions du fournisseur. Entre chaque étape de lavage, une centrifugation de 15 secondes à 8000 x g est réalisée. Les ARN totaux sont élués dans un volume final de 30µL d'eau dépourvue de RNase/DNase (Applied Biosystems) et dénaturés à 65°C pendant 5 minutes puis placés à 4°C pour le dosage (afin d'éviter leur renaturation). Les ARN extraits et dosés sont conservés à -80°C pour les utilisations futures.

La quantité d'ARN totaux extraits est déterminée par mesure spectrophotométrique à l'aide du NanoDrop® ND-1000. Cet appareil renseigne également sur la pureté des ARN extraits. Trois absorbances sont mesurées : 230nm, 260nm et 280nm.  $A_{260}$  correspond à la concentration d'ARN de l'échantillon calculée par la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = \frac{(A_{260} \times 40 \mu\text{g} / \mu\text{L})}{\text{volume} \quad \text{ARN}} \quad \text{où } 40 \text{ est le coefficient d'extinction molaire de l'ARN}$$

Le rapport  $A_{260}/A_{230}$  informe sur le contenu en sels de l'échantillon, il est idéalement supérieur à 2. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  renseigne la pureté de l'extraction, il est idéalement compris entre 1,9 et 2,1.

L'intégrité des ARN extraits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en tampon Tris-base 90mM, Borate 90mM et EDTA 2.5mM pH 8 (Sigma) à partir de 400ng d'ARN préparés (v/v) en tampon de charge contenant du bromure d'éthidium et du bleu de bromophénol (Sigma). Les échantillons migrent 40 minutes à 80 Volts. Les ARN sont visibles sous UV à 305nm dans une station d'imagerie Kodak Gel Logic 2200 (Kodak, La Hulpe, Belgique) à l'aide du logiciel éponyme.

### **3.2°) Rétrotranscription des ARN totaux**

Tous les réactifs utilisés dans le protocole de rétrotranscription des ARN totaux sont fournis par Invitrogen, sauf mention contraire.

Les ARN extraits sont convertis en ADN complémentaires (ADNc) par l'emploi de l'enzyme transcriptase inverse. La forme ADNc est plus stable et permet la détection des transcrits correspondants par PCR quantitative en temps réel.

La procédure est la suivante : 1µg d'ARN est ajouté dans un volume réactionnel de 19µL contenant de l'eau dépourvue de RNase/DNase, 4µL de tampon RT 5X (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 4µL d'un mélange des 4 dNTPs à 2,5mM, 1µL d'hexamères aléatoires à 0,2 µg/µL et 2µL de DTT à 0,1M. Le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 2 minutes avant d'ajouter 1µL de transcriptase inverse Superscript II à 200U/µL. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (Biorad, Nazareth, Belgique), réglé avec le programme suivant : 1 cycle à 42°C pendant 50 minutes (rétrotranscription des ARN totaux en ADNc) puis 1 cycle à 70°C pendant 15 minutes (inactivation de l'enzyme). Les ADNc synthétisés sont stockés à -20°C jusqu'à analyse en PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).

### **3.3°) Choix des amorces pour la PCR quantitative en temps réel**

Afin de détecter le niveau d'expression du transcrit d'intérêt, les ADNc obtenus sont utilisés en PCR avec des amorces spécifiques pour ce transcrit. La conception des amorces passe par l'utilisation du logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, USA). Les amorces sont conçues selon les critères suivants : taille comprise entre 18 et 22 pb, pourcentage en nucléotides G et C le plus proche de 50% (stabilité thermodynamique accrue), génération d'un produit d'amplification de taille

comprise entre 75 et 150pb, encadrement d'un intron (affranchissement de l'amplification d'ADN génomique contaminant), vérification de la spécificité d'hybridation des amorces grâce à l'algorithme Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Pour tenir compte de la variabilité expérimentale introduite par l'extraction puis la rétrotranscription, les résultats de RT-qPCR seront analysés par comparaison avec l'expression d'un gène de référence, c'est-à-dire dont l'expression est constitutive et globalement stable au cours du temps, ici la  $\beta$ -actine.

### 3.4°) PCR quantitative en temps réel

L'appareil utilisé pour cette technique est le iCycler<sup>®</sup> (Biorad), c'est un thermocycleur équipé d'un système de détection de fluorescence. La PCR quantitative est une méthode d'amplification des ADNc par polymérisation en chaîne permettant de quantifier les amplicons au fur et à mesure de leur formation grâce à l'incorporation d'un agent intercalant fluorescent, le SYBR<sup>®</sup> Green (Biorad) ; contrairement à la PCR conventionnelle qui nécessite une analyse terminale du produit d'amplification sur gel d'agarose.

Les réactions de PCR quantitative en temps réel sont réalisées en duplicats expérimentaux dans une plaque 96 puits (Biorad), dans un volume réactionnel final de 20 $\mu$ L. 4 $\mu$ L d'ADNc dilué au 1/10<sup>ème</sup> sont ajoutés à 16 $\mu$ L d'un mélange contenant 300nM d'amorces sens et antisens et du iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Supermix (Biorad) Ce mélange est composé des éléments suivants : iTaq polymérase (50U/mL), dNTPs (0,4mM de chaque), SYBR Green (20nM), KCl (100mM), Tris-HCl pH 8,4 (40mM), et MgCl<sub>2</sub> (6mM). La polymérase est activée lors d'un cycle de 3 minutes à 95 °C, puis l'amplification des ADNc est rendue possible par la succession de plusieurs phases : 1°) dénaturation des ADN double brins (à 95°C), 2°) hybridation des amorces (température spécifique de la paire employée) et élongation (à 72°C). Ces deux phases sont répétées 40 fois.

En suivant en temps réel l'émission de fluorescence, corrélée à la fixation du fluorophore sur l'ADN double brin, en fonction du nombre de cycles de PCR, on obtient une sigmoïde. Le logiciel de pilotage de l'appareil (iQ<sup>™</sup> Software, Biorad) calcule alors le Ct, défini comme le nombre de cycles (« point de sortie »),

correspondant au moment à partir duquel la fluorescence devient détectable à la fin de la phase d'élongation.

Après le dernier cycle de PCR, l'appareil réalise une courbe de fusion : la température est élevée lentement de 55 à 95°C, la fluorescence est lue en continu. Il se forme un pic, à une température donnée dite température de fusion, ce pic correspond au produit d'amplification et doit être unique afin de garantir l'absence de contamination par l'ADN génomique.

L'exploitation des résultats de qPCR est réalisée avec la macro Excel Genex fournie par BioRad. Le gène de la  $\beta$ -actine est utilisé comme gène de référence. Les niveaux d'expression sont calculés selon la méthode de quantification relative des  $\Delta\Delta C_t$  qui prend en compte l'efficacité de PCR des amorces employées. Les résultats sont normalisés par rapport aux échantillons contrôles ou à la quantité relative de  $\beta$ -actine. Les amorces employées sont décrites dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12 :** caractéristiques des amorces employées en PCR quantitative

Gène	Numéro d'Accession Genbank	Température d'hybridation (°C)	Efficacité de PCR	Séquences
A2AAR	NM_000675	64 °C	103,1 %	Sens 5'-TCTTCAGTCTCCTGGCCATC-3' Antisens 5'-GGGACCACATCCTCAAAGAG-3'
A2BAR	NM_000676	60 °C	102,7 %	Sens 5'-CTCCATCTTCAGCCTTCTGG -3' Antisens 5'-ACAAGGCAGCAGCTTTCATT-3'
A3AR	NM_000677	62 °C	100,5 %	Sens 5'-TCATCTGCGTGGTCAAGC-3' Antisens 5'-CTGTAGAAGTGGATTGTGATGC-3'
$\beta$ -actine	NM_001101	60 °C	102,6 %	Sens 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' Antisens 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'
CD14	NM_000591	56 °C	99,7 %	Sens 5'-TAAAGCACTCCAGAG-3' Antisens 5'-AATCTTCATCGTCCAG-3'
MD-2 (LY-96)	NM_015364	60 °C	97 %	Sens 5'-TGCCGAGGATCTGATGAC-3' Antisens 5'-ATTAGGTTGGTGTAGGATGAC-3'
MMP-9	NM_004994	62 °C	106,6 %	Sens 5'-AACTACGACACCGACGAC-3' Antisens 5'-CAGGCGGAGTAGGATTGG-3'
TLR-4	NM_138554	60 °C	114,5 %	Sens 5'-ATCCAGGTGTGAAATCCAGAC-3' Antisens 5'-AGGCTCCCAGGGCTAAAC-3'

## 4°) Etude de l'expression des protéines d'intérêt

### 4.1°) Western blotting

#### 4.1.1°) Traitements des échantillons

Après avoir été rincées à 2 reprises dans du PBS, les cellules sont lysées dans 100µL de tampon de lyse cellulaire pendant 10 minutes à 4°C (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) et un inhibiteur de phosphatases, le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, Sigma). Le tampon de lyse cellulaire contient les éléments suivants : 20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM de NaCl, 1mM d'EDTA et EGTA, 1% de Triton X-100, 2.5mM de pyrophosphate de sodium, 1mM de β-glycérophosphate, 1mM d'orthovanadate de sodium Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1µg/ml de leupeptine. Après incubation, l'échantillon est collecté puis passé au moins 10 fois dans une seringue à cathéter de 26G (disruption des structures membranaires résiduelles), puis centrifugé 15 minutes à 12 000 x g. Le surnageant est collecté puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

#### 4.1.2°) SDS-PAGE

La concentration en protéines présentes dans le lysat cellulaire est évaluée grâce au kit de dosage colorimétrique BCA (Pierce Technology, Rockford, USA). Le réactif utilisé est l'acide bicinchoninique. La réaction chimique consiste à incuber l'échantillon de protéines en présence d'une solution de cuivre (II) et de BCA, les protéines ont la capacité de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) qui interagit avec le BCA pour former un composé pourpre. L'intensité de coloration ainsi obtenue est donc proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Chaque mesure est réalisée en duplicats sur 10µL d'échantillon en présence de 200µL de réactif BCA/cuivre (II), le mélange est incubé 30 minutes à 37°C à l'obscurité en microplaque 96 puits. Après incubation, la plaque est refroidie à la température de la pièce et l'absorbance est mesurée à 562nm (possible entre 540nm et 592 nm) sur un spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH). La concentration en protéines est évaluée en réalisant une gamme d'étalonnage à l'aide

d'une protéine de référence (ici Albumine Sérique Bovine, BSA). La droite d'étalonnage est établie par régression linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. Les concentrations calculées sont exprimées en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La limite de linéarité de ce dosage est comprise entre  $0.125\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Après mesure de la concentration en protéine, les échantillons sont aliquotés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse en Western blot.

A un volume de  $25\mu\text{L}$  d'extrait protéique de concentration connue sont ajoutés  $5\mu\text{L}$  de tampon de charge 6X contenant  $375\text{mM}$  de Tris-HCl, 12% de SDS, 50% de glycérol,  $300\text{nM}$  de DTT et 0.2% de bleu de bromophénol (Sigma). Les échantillons sont ensuite dénaturés à  $98^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. Un marqueur de poids moléculaire (All Blue<sup>®</sup> de Biorad) est déposé sur chaque gel afin de vérifier la taille de la protéine d'intérêt. La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel de séparation à 8% d'acrylamide/bisacrylamide 37,5:1 de Biorad). Les échantillons sont soumis à une migration à voltage constant (100 Volts) pendant 2 heures.

#### 4.1.3°) Electro-transfert sur membrane et révélation

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, Biorad) dans une cuve de transfert (Biorad) contenant un tampon de transfert ( $25\text{mM}$  de Tris-Base,  $192\text{mM}$  de glycine et 20% de méthanol, Sigma) pendant 1 heure à 100 Volts. La membrane est ensuite saturée 1 heure dans un tampon Tris-Buffered Saline-Tween TBST ( $25\text{mM}$  Tris-Base,  $150\text{mM}$  NaCl, 0,05% Tween<sup>®</sup> 20, Sigma) contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane est ensuite rincée 5 fois 10 minutes par du tampon TBST puis incubée sur la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  en présence de l'anticorps primaire (IgG) dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué dans du TBST contenant 5% de lait écrémé en poudre. La liste des anticorps, substrats et dilutions employés est présentée dans le **Tableau 13**.

Après incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est lavée 5 fois 10 minutes avec du tampon TBST puis incubée 1 heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans du TBST contenant 5% de lait écrémé en poudre (la liste des anticorps secondaires est présentée **Tableau 13**). La membrane est lavée 5

fois 10 minutes dans du TBST puis révélée sur une station d'imagerie Kodak Gel Logic 2200 avec un substrat chimioluminescent de la peroxydase de Raifort (Pierce). Les intensités lumineuses des protéines d'intérêt sont rapportées à celles correspondant à la GAPDH, protéine de référence d'expression stable dans toutes les expériences effectuées au sein du laboratoire.

**Tableau 13 :** liste des anticorps et substrats employés en Western Blot

Protéine cible	Type d'anticorps	Espèce	Facteur de dilution	Diluant	Fournisseur de l'anticorps	Substrat employé	Fournisseur du substrat
TLR4	Primaire polyclonal	Lapin	10 <sup>3</sup>	TBST 5% lait	SantaCruz Biotechnologies	West extended Duration Substrate	Pierce
GAPDH	Primaire monoclonal	Souris	10 <sup>3</sup>	TBST 5% lait	SantaCruz Biotechnologies	ECL Detection Kit	Pierce
Anti-souris couplé à HRP	Secondaire polyclonal	Ane	2.10 <sup>4</sup>	TBST 5% lait	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.	/	/
Anti-lapin couplé à HRP	Secondaire polyclonal	Ane	2.10 <sup>4</sup>	TBST 5% lait	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.	/	/

#### 4.1.4°) Analyse densitométrique

Les images générées lors de la révélation sont analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse densitométrique, AIDA (Raytest, Tilburg, Pays-Bas). L'intensité des bandes est quantifiée et convertie en valeurs numériques (unités arbitraires). Les analyses densitométriques sont ensuite représentées en exprimant le rapport suivant pour un échantillon donné :

$$\frac{\text{Densité TLR4}}{\text{Densité GAPDH}}$$

#### 4.2°) Analyse de l'activité gélatinase de la MMP-9 : zymographie

##### 4.2.1°) Principe de la technique

Il s'agit d'une technique simple, sensible, semi-quantitative et permettant une étude fonctionnelle. Elle consiste à réaliser une électrophorèse en gel SDS-PAGE (en

conditions non réductrices), en incorporant le substrat de l'enzyme dans le gel. Dans notre étude, nous désirons détecter la gélatinase MMP-9, ainsi le substrat sera la gélatine B. Durant l'électrophorèse, le SDS dénature les MMPs. Après électrophorèse, le gel est lavé, ce qui permet de remplacer le SDS par du Triton X-100. Ainsi les enzymes sont partiellement renaturées et recouvrent leur activité. Le gel est ensuite incubé dans un tampon permettant l'activité enzymatique des MMPs. Après incubation, le gel est coloré au bleu de Coomassie et les MMPs sont détectées par des bandes claires qui ressortent du reste du gel (qui est bleu car le substrat n'est pas dégradé). Les bandes claires peuvent être ainsi quantifiées par densitométrie et témoignent de l'activité des MMPs.

Une autre utilité de la zymographie est de distinguer la forme zymogène de la forme active selon leurs poids moléculaires (utilisation de marqueurs de poids moléculaires).

#### **4.2.2°) Mode opératoire**

Chaque milieu de culture est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est collecté et additionné d'une solution cryoprotectrice contenant de la BSA et un cocktail d'inhibiteurs de protéase dépourvu d'EDTA (Roche). Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide 8% contenant 0.2% de gélatine B en conditions non réductrices, après avoir été dilués (1/100<sup>ème</sup>).

Après électrophorèse à 100V pendant 2 heures, les gels sont renaturés dans un tampon de renaturation contenant 2.5% de triton X-100 (Sigma) sous agitation pendant 3 fois 20minutes. Les gels sont ensuite incubés toute la nuit à 37°C dans un tampon permettant l'activité des MMPs (Tris 0,5M, Brij 35 0,2 %, NaCl 2M, CaCl<sub>2</sub> 50mM à pH 7.6, Sigma). Les gels sont ensuite colorés avec une solution contenant 0.1% de bleu de Coomassie G250 (Biorad), 10% d'acide acétique et 40% de méthanol (15 minutes sous agitation) et sont ensuite décolorés avec une solution contenant 10% d'acide acétique et 30% de méthanol (5 minutes sous agitation) pour visualiser les bandes. Enfin on place les gels dans du contrastant. Chaque gel est scanné et les bandes sont quantifiées par densitométrie à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (AIDA). Les gels analysés sont ensuite séchés et conservés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires.

#### 4.3°) Dosage immunoenzymatique de MMP-9 et TNF- $\alpha$

La MMP-9 (zymogène et forme active) et le TNF- $\alpha$  sont mesurés dans les milieux de culture cellulaire par ELISA grâce aux kits Quantikine® Human total MMP-9 et TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Oxon, Royaume-Uni) selon les instructions du fournisseur.

Nous réalisons ici un ELISA direct de type « sandwich » colorimétrique en microplaque. Les milieux de culture sont dilués 20 fois pour la mesure de TNF- $\alpha$  et 100 fois pour la mesure de MMP-9 et déposés dans les puits d'une microplaque recouverts d'anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$  ou anti-MMP-9 immobilisés, puis incubés 2 heures à température ambiante. Après une étape de lavage pour éliminer toutes les protéines non liées, nous ajoutons un anticorps monoclonal (anti-TNF- $\alpha$  ou anti-MMP-9) couplé à la peroxydase de raifort (HRP) pendant 1 heure. Après une seconde étape de lavage, un substrat chromogène de l'HRP est ajouté (peroxyde d'hydrogène et tétraméthylbenzidine) et incubé 30 minutes à l'obscurité pour permettre à la coloration de se développer. L'arrêt de la réaction est provoqué par l'ajout d'acide sulfurique à 2N. Parallèlement à la préparation des échantillons, une gamme d'étalonnage est réalisée par dilution en cascade de TNF- $\alpha$  ou MMP-9 recombinants fournis dans les kits.

L'absorbance est ensuite lue à 450nm dans un spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH). La droite d'étalonnage est établie par régression linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. La limite de détection est de 1.6ng/mL pour TNF- $\alpha$  et 156 pg/ml pour MMP-9.

#### 5°) Cytométrie en flux

La cytométrie en flux, appliquée en biologie, est une technique d'analyse permettant d'étudier une population cellulaire, entraînée par un flux liquide dans un faisceau laser. La lumière émise par le laser est diffractée par les cellules, ce qui renseigne sur les propriétés physiques intrinsèques des cellules (taille, granulométrie) mais permet également d'étudier une sous-population marquée à l'avance au niveau de structures ou de fonctions cellulaires particulières (membranes, appareil de Golgi, etc.) par un ou plusieurs fluorophores.

Les signaux émis par la ou les populations d'intérêt sont ensuite collectés grâce à des photomultiplicateurs, ils seront amplifiés puis numérisés. Un traitement informatique adapté permet de les représenter graphiquement sous forme de nuages de points ou d'histogrammes.

Les expériences de cytométrie en flux ont été conduites à la plateforme de cytométrie en flux du Centre de Recherche Public en Santé à Luxembourg. L'appareil utilisé est un cytomètre BD FACS Canto™ (BD Biosciences). Le logiciel d'analyse utilisé pour le traitement des données est FACS Diva™ version 5.0.2 (BD Biosciences). Le logiciel de représentation graphique tridimensionnelle employé pour générer certaines figures est Flowjo v7.2.4 (Tree Star Inc, Ashland, USA).

## **5.1°) Marquage extracellulaire**

### **5.1.1°) Etude MMP-9**

Les macrophages THP-1 prétraités ou non par 10µM d'adénosine/EHNA puis stimulés ou non par 100ng/mL de LPS ont été utilisés pour la détection de l'expression de surface du récepteur TLR4 et de la protéine CD14. Les anticorps utilisés sont les suivants : anticorps monoclonaux de souris anti-TLR4 couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, clone HTA125, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) et anti-CD14 couplés à l'allophycocyanine-cyanine 7 (APC-Cy7, clone MφP9, BD Biosciences), avec les contrôles isotypiques appropriés.

Les macrophages THP-1 sont détachés des plaques de culture à l'aide de tampon de dissociation cellulaire (Cell Dissociation Buffer, Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Après 2 lavages en PBS supplémenté avec 1% de BSA, nous prélevons 10<sup>6</sup> cellules que nous marquons avec 5µL d'anticorps dans un volume final de 50µL de PBS supplémenté avec 1% de BSA. Les tubes sont ensuite lus par le cytomètre réglé pour capturer 10 000 évènements.

### **5.1.2°) Etude TLR4**

Pour mesurer l'expression de surface de TLR4, nous avons utilisé des macrophages primaires. Les traitements ont été réalisés de la façon suivante : pré-

traitement par  $\pm 10\mu\text{M}$  d'adénosine/EHNA à  $10\mu\text{M}$  pendant 15 minutes puis traitement par  $100\text{ng/mL}$  de LPS pendant 24 à 48 heures. Nous avons également réalisé des expériences cinétiques dans lesquelles les macrophages primaires sont traités par  $10\mu\text{M}$  d'adénosine/EHNA ou  $100\text{ng/mL}$  de LPS pendant respectivement 1, 5, 20 et 60 minutes.

Après traitements, les macrophages primaires sont détachés des plaques de culture dans du tampon de dissociation cellulaire et lavés en PBS contenant 1% de BSA puis conservées sur glace. Nous prélevons ensuite  $2.10^5$  cellules pour chaque marquage. Les cellules sont incubées avec du Fc Blocking Reagent (Miltenyi) et marquées pendant 30 minutes à  $4^\circ\text{C}$  à l'obscurité avec les anticorps suivants : anticorps monoclonaux de souris anti-TLR4 couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, clone HTA125, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), anti-CD14 couplés à la phycoérythrine-cyanine 7 (PE-Cy7, clone M5E2, BD Biosciences), anti-CD45 couplés à la protéine peridinine-chlorophylle (Per-CP, clone 2D1, BD Biosciences), avec les contrôles isotypiques appropriés.

Après marquage, les cellules sont fixées à l'aide de la solution FACS Lysing 1X (BD Biosciences) pendant 30 minutes à l'obscurité jusqu'à lecture au cytomètre réglé pour capturer 20 000 évènements.

## 5.2°) Marquage intracellulaire

Lors de l'étude TLR4, nous avons étudié la production de  $\text{TNF-}\alpha$  au niveau intracellulaire par cytométrie en flux. Nous avons utilisé des macrophages primaires pré-traités par  $\pm 10\mu\text{M}$  d'adénosine/EHNA à  $10\mu\text{M}$  pendant 15 minutes puis traités par  $100\text{ng/mL}$  de LPS pendant 24 heures. 4 heures avant la fin des traitements, les cellules sont incubées avec de la brefeldin A (GolgiPlug™, BD Biosciences) qui va bloquer le transport des cytokines au niveau de l'appareil de Golgi. Après traitement, les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du produit Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) selon les instructions du fournisseur. Le marquage intracellulaire du  $\text{TNF-}\alpha$  est ensuite réalisé selon le même protocole que celui employé section 5.1.2 avec l'anticorps murin monoclonal suivant : anti- $\text{TNF-}\alpha$  couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, clone MAB11, eBioscience, San Diego, USA).

Après marquage, les cellules sont analysées au cytomètre réglé pour capturer 20 000 évènements.

## 6°) Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisée en biologie pour mettre en évidence des biomolécules présentes à la surface d'une cellule ou au niveau intracellulaire, par microscopie optique ou confocale. Elle repose sur la complémentarité d'un anticorps pour son antigène cible. Pour les expériences d'immunofluorescence de l'étude TLR4, nous avons employé les macrophages issus de la lignée THP-1.

Les monocytes THP-1 sontensemencés à  $8.10^4$  cellules par condition en plaques 24 puits, sur lamelle de verre. La différenciation des monocytes en macrophages est induite par l'ajout de 150nM de PMA pendant 48 heures. Après différenciation les macrophages THP-1 sont traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être stimulés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. Une autre expérience a été conduite en différenciant les monocytes THP-1 en macrophages pendant 24 heures puis en les stimulant avec  $\pm$  10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA seule pendant 15 minutes.

Toutes les manipulations d'immunofluorescence sont réalisées à température ambiante. Après traitement, les lamelles sont collectées puis fixées au paraformaldéhyde (10 minutes). Pour effectuer un marquage intracellulaire, une étape supplémentaire de perméabilisation est mise en œuvre après la fixation en incubant les lamelles pendant 10 minutes dans une solution de PBS contenant 1% de Tween®. Après fixation/perméabilisation, les lamelles sont bloquées dans une solution de PBS contenant 3% de BSA pendant 1 heure. Entre chaque étape, les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS.

Le marquage est ensuite effectué de manière indirecte en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-TLR4 (Santacruz biotechnologies, Santa Cruz, USA) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®, Invitrogen), l'anticorps primaire est incubé pendant 1 heure, les lamelles sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS puis l'anticorps secondaire est incubé 45 minutes. Après l'incubation avec le secondaire, une étape de coloration des noyaux à l'aide du 4',6-

diamidino-2-phénylindole (DAPI, Invitrogen) est réalisée, en introduisant le DAPI dans le PBS de lavage.

Les images sont capturées à l'aide d'un microscope optique à fluorescence (LEICA DMIL, Leica Microsystems, Howald, Luxembourg) relié à une caméra DFC300 FX (Leica), pilotée par le logiciel Leica LAS version 3.0. Toutes les images sont réalisées à l'objectif x100 à l'immersion. Nous avons également utilisé un microscope confocal à fluorescence (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510, Carl Zeiss, Zaventem, Belgique) pour capturer des images sous objectif x63 à l'immersion à l'aide du logiciel LSM 510 META (Carl Zeiss).

## **7°) Analyse statistique**

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., San José, USA). Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs de plusieurs expériences  $\pm$  déviation standard (SD). Les données avec une distribution Gaussienne ont été analysées avec le test *t* de Student. Les données avec une distribution non Gaussienne ont été analysées avec le test Mann-Whitney (données non appariées) ou le test de Wilcoxon (données appariées). Pour comparer plusieurs groupes, nous avons employé l'analyse de la variance (ANOVA). Une valeur *p* inférieure à 0.05 est considérée significative pour les différences observées entre les traitements.

## **Chapitre 2 : recherche de biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde par analyse protéomique de protéines plasmatiques**

### **1°) Pré-requis pour la mise en place d'une étude protéomique**

La protéomique est une discipline visant à cribler à très haut débit des protéines d'intérêt dans une population d'échantillons donnée, afin d'en étudier leurs niveaux d'expression, leurs modifications post-traductionnelles, leurs localisations (tissulaires, subcellulaires). Elle exige de suivre un certain nombre de règles afin de réduire les variabilités expérimentales et de favoriser les échanges et collaborations entre équipes de recherche. La mise en place en 2003 du Human Plasma Proteome Project par la Human Proteome Organization a posé les bases de travail sur le plasma d'origine humaine (source : [www.hupo.org/research/hpp](http://www.hupo.org/research/hpp)).

Prenons l'exemple de la recherche de biomarqueurs par analyse différentielle du niveau d'expression des protéines. En premier lieu, le choix de la population d'étude doit être établi de manière à réduire au maximum la variabilité expérimentale, c'est-à-dire le nombre de critères discriminants une population A d'une population B. Dans un second temps, il convient de porter la plus extrême attention à la préparation de l'échantillon à soumettre à une analyse protéomique. Il faut veiller à réduire au strict minimum le nombre d'étapes allant du prélèvement de l'échantillon à sa résolution.

### **2°) Le registre LUCKY et la sélection des patients pour l'étude protéomique**

Nous avons choisi pour cette étude 30 patients du registre LUCKY, d'origine Caucasienne, non diabétiques, souffrant de leur premier infarctus du myocarde. Chaque patient intégré dans l'étude a signé un formulaire de consentement. Les 30 patients sélectionnés ont subi une angioplastie coronarienne. Afin d'évaluer la dysfonction du ventricule gauche et le pronostic insuffisance cardiaque *versus* guérison, nous avons choisi les paramètres suivants : fraction d'éjection du ventricule gauche au suivi médical à 4 mois et 1 an post-infarctus, ainsi que la classification

fonctionnelle NYHA. Les données démographiques et cliniques concernant les 30 patients LUCKY sont représentées dans le **Tableau 14**.

**Tableau 14 :** caractéristiques cliniques et démographiques des 30 patients souffrant d'infarctus du myocarde inclus dans l'étude protéomique

<b>Age, année (moyenne ± SD)</b>	54	±10
<b>Sexe masculin, n (%)</b>	30	100%
<b>Indice de Masse Corporelle (moyenne ± SD)</b>	26	±4
<b>Marqueurs plasmatiques (moyenne ± SD)</b>		
<b>CPK (Unités/L)</b>	2412	1642
<b>TnT (ng/mL)</b>	6.0	4.3
<b>hsCRP (ng/mL)</b>	14.8	14.8
<b>Antécédents, n (%)</b>		
<b>Infarctus du myocarde</b>	0	0%
<b>Pontage aorto-coronarien</b>	1	3%
<b>Angioplastie coronarienne</b>	29	97%
<b>Diabète</b>	0	0%
<b>Hypertension</b>	8	27%
<b>Hypercholestérolémie</b>	7	23%
<b>Tabac</b>	18	60%
<b>Médicaments, n (%)</b>		
<b>Bêtabloquants</b>	29	87%
<b>Antagonistes du calcium</b>	0	0%
<b>Nitrates</b>	3	10%
<b>IEC</b>	20	67%
<b>Statines</b>	26	87%
<b>Inhibiteurs de l'angiotensine</b>	0	0%

*Tous les patients ont subi avec succès une reperfusion mécanique et un stenting de l'artère infarctée dans les 12 heures suivant l'apparition de l'angine de poitrine. Tous les patients ont reçu de l'aspirine, de l'héparine, du clopidogrel et de l'abciximab. CPK : créatine phosphokinase ; hsCRP : protéine C réactive haute sensibilité ; IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; TnT : troponine T.*

### **3°) Prélèvement du plasma pour l'étude protéomique et déplétion des protéines hautement exprimées**

La collecte de plasma est effectuée par prise de sang lorsque le patient se présente à l'hospitalisation. Nous avons utilisé le système BD P100™ Blood collection system (BD Biosciences). Ces tubes, spécialement conçus pour des applications en protéomique, sont recouverts d'anticoagulant (EDTA) et de stabilisateurs de protéines et contiennent un séparateur mécanique qui permettra une parfaite séparation entre le plasma et les cellules sanguines après une étape de centrifugation à 2500 x g pendant 20 minutes à 10°C.

Le plasma étant un fluide biologique très riche en protéines (60 à 80 g/L), l'étape suivante consiste à en éliminer les protéines les plus hautement exprimées afin d'affiner le niveau de sensibilité de la technique de 2D-DiGE. En effet, 10 à 20 protéines sont très fortement présentes dans le plasma et représentent environ 98% en concentration dont 95% d'albumine sérique humaine (HSA) et d'Immunoglobulines G (IgG). Ces protéines peuvent gêner la détection d'espèces protéiques moins exprimées.

Le plasma collecté est soumis à une déplétion sélective de l'HSA et des IgGs par passage sur résine d'affinité pour ces 2 types de protéines à l'aide d'un kit commercial (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne). Concrètement, 20µL de plasma sont introduits et incubés dans une micro-colonne contenant 440µL de résine d'affinité pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation, puis centrifugés à 400 x g pendant 1 minute, l'effluent est collecté. La résine d'affinité est ensuite rincée à l'aide de 200µL de tampon de rinçage fourni dans le kit, le volume de rinçage est ajouté à l'effluent.

La concentration en protéines dans le plasma dépleté est évaluée grâce au kit de dosage colorimétrique BCA. Chaque mesure est réalisée en duplicats sur 25µL d'échantillon en présence de 200µL de réactif BCA/cuivre (II), le mélange est incubé 30 minutes à 37°C à l'obscurité en microplaque 96 puits. Après incubation, la plaque est refroidie à la température de la pièce et l'absorbance est mesurée à 562nm sur un spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH). La concentration en

protéines est évaluée en réalisant une gamme d'étalonnage à l'aide d'une protéine de référence (BSA). La droite d'étalonnage est établie par régression linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. Les concentrations calculées sont exprimées en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La limite de linéarité de ce dosage est comprise entre  $0.025\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Après mesure de la concentration en protéines, les échantillons sont aliquotés et stockés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à analyse protéomique.

#### **4°) Analyse protéomique par 2D-DiGE**

##### **4.1°) Principe de la technique**

La technique de 2D-DiGE est une variante de l'électrophorèse bidimensionnelle. Son but est d'étudier les variations d'expression des protéines entre 2 ou plusieurs échantillons. Elle repose sur l'utilisation de 3 composés fluorescents appartenant à la famille des cyanines, les Cy2, Cy3 et Cy5 qui vont interagir avec les chaînes latérales des lysines. Les cyanines 3 et 5 seront utilisées pour marquer différemment 2 échantillons à comparer sur un même gel 2D alors que la cyanine 2 sera utilisée comme témoin afin de comparer l'ensemble des gels d'une expérience. Pour ce faire, il faut réaliser un mélange équimolaire de chaque échantillon (standard interne) d'une série d'expérience et marquer ce mélange à l'aide de la cyanine 2. Sur un gel seront donc déposés : un premier échantillon marqué Cy3, un second échantillon marqué Cy5 et le standard interne marqué Cy2. Le gel est ensuite soumis à électrophorèse bidimensionnelle, ce qui permettra la séparation des protéines selon leur point isoélectrique (première dimension) et selon leur taille (seconde dimension).

Les gels obtenus après résolution sont scannés dans un appareil d'imagerie aux 3 longueurs d'onde respectives des Cy2, 3 et 5. Les images générées sont ensuite analysées par un logiciel d'analyse différentielle et les entités différemment exprimées sont sélectionnées puis prélevées, digérées par réaction enzymatique, hybridées sur cible MALDI/TOF-TOF et analysées en spectrométrie de masse. L'étape suivante consiste à identifier les entités hybridées sur cible en comparant les résultats de spectrométrie de masse aux bases de données de protéines existantes.

#### 4.2°) Traitement des plasmas déplétés et marquage fluorescent

Tous les réactifs utilisés dans ce protocole expérimental sont fournis par GE Healthcare (Uppsala, Suède) sauf mention contraire.

Les plasmas déplétés sont décongelés lentement sur glace. Préalablement, le pH des échantillons est ajusté à 8,5 par l'ajout d'une solution de Tris 3M. 30µg sont prélevés pour le marquage. Les 30 plasmas seront marqués aléatoirement de la façon suivante : 15 plasmas marqués Cy3 et 15 plasmas marqués Cy5. Un standard interne contenant un mélange équimolaire de chaque échantillon est constitué et sera marqué Cy2, 30µg de ce mélange seront chargés sur chaque gel pour permettre l'analyse inter-gel.

Le marquage est ensuite réalisé en introduisant 240pmol de marqueur fluorescent pour 30µg de protéines par microtube. Chaque microtube est incubé à l'obscurité et à 4°C pendant 30 minutes. Après l'incubation, 1µL de solution de lysine à 10mM est ajouté à chaque microtube afin de stopper le marquage. Le mélange est incubé au moins 10 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les protéines sont désormais marquées.

Nous combinons ensuite aléatoirement un échantillon marqué Cy3, un échantillon marqué Cy5 et le standard interne marqué Cy2 dans un nouveau microtube. Le volume est ajusté à 450µL avec un tampon d'électrophorèse 2D (7M Urée, 2M Thiourée, 0.5% CHAPS, traces de bleu de bromophénol). Nous ajoutons ensuite 9µL de tampon ampholyte biolyte pH 3-10 (Biorad) et 2,7 µl de réactif destreak.

Le tampon d'électrophorèse 2D est chaotrope et permet de briser les liaisons hydrogène et hydrophobes par la présence d'urée et de thiourée ; il contient également un détergent zwitterionique (CHAPS) qui solubilise les lipides et brise les liaisons hydrophobes. Le tampon d'ampholyte favorise la solubilisation des protéines et les empêche d'interagir avec les immobilines (acide ou base faibles) contenues dans les bandelettes d'électrophorèse 2D. Le réactif destreak est employé pour réduire les protéines à l'état oxydé et permet d'éviter la formation de stries lors de la seconde dimension de l'électrophorèse.

Les échantillons préparés sont ensuite soumis à une électrophorèse bidimensionnelle.

### 4.3°) Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est divisée en 2 étapes, une première étape dite d'isoélectrofocalisation (IEF) durant laquelle les protéines vont être séparées selon leur point isoélectrique, c'est-à-dire le point où la charge nette globale de la protéine est égale à 0 ; puis une seconde étape d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) afin de séparer les protéines selon leur taille.

#### 4.3.1°) Première dimension – isoélectrofocalisation

Cette étape est réalisée en utilisant des bandelettes de polyacrylamide déshydratées de 24cm contenant un gradient de pH immobilisé non linéaire couvrant une zone de 3 à 10 unités pH (bandelettes IPG, Biorad). Ces bandelettes sont dites à spectre large.

En premier lieu, il convient de réhydrater les bandelettes IPG. Parmi les différentes techniques de réhydratation, nous avons opté pour la réhydratation passive avec l'échantillon. L'échantillon (450µL) est déposé le long d'une chambre de réhydratation puis la bandelette IPG est placée au dessus en veillant à éliminer les bulles d'air. L'ensemble est ensuite recouvert d'une huile minérale, favorisant la réhydratation et empêchant l'évaporation, et incubé 18 heures à l'obscurité. Cette technique de réhydratation permet, lorsque l'échantillon s'y prête comme le plasma, de maximiser l'entrée des protéines dans la bandelette IPG.

La bandelette IPG réhydratée contenant l'échantillon est ensuite rincée à l'eau bidistillée puis placée dans l'appareil d'IEF IPGphore III (**Figure 14**) réglé à 20°C, puis recouverte d'huile minérale pour éviter l'évaporation. Le programme d'IEF est divisé en 2 étapes : 21 heures durant lesquelles le courant est progressivement augmenté de 30 à 10,000 V, suivi d'une étape de 8 heures à voltage constant de 10,000 V. Ces conditions ont été déterminées de manière empirique afin de favoriser au mieux la séparation des protéines le long du gradient de pH.



**Figure 14 :** focalisateur IPGphore III (source : <http://www.gelifesciences.com/>)

Une fois l'IEF achevée, la bandelette IPG est rincée à l'eau distillée puis équilibrée dans un premier temps dans une solution de DTT préparée dans un tampon d'équilibration commercial (2D Gel DALT, Gelcompany, San Francisco, USA) contenant de l'urée pendant 15 minutes. Un second bain de 15 minutes dans une solution d'iodoacétamide préparée en tampon d'équilibration est effectué. Cette étape est nommée réduction-alkylation et est nécessaire pour dénaturer complètement les protéines. La bandelette est maintenant prête pour la seconde dimension.

#### 4.3.2°) Deuxième dimension – SDS-PAGE

La SDS-PAGE est réalisée avec des gels de polyacrylamide commerciaux de 24cm de large, à 12.5% acrylamide/bisacrylamide (2D Gel DALT, Gelcompany). Le système 2D utilisé est l'Ettan DALT II module *twelve* qui permet de faire migrer jusqu'à 12 gels en une seule expérience (**Figure 15**).



**Figure 15 :** appareil d'électrophorèse bidimensionnelle Ettan DALT II module twelve  
(source : <http://www.gelifsciences.com/>)

Le gel est placé dans une cassette puis la bandelette IPG est introduite dans l'interstice présent au-dessus du gel en respectant le sens des électrodes indiqué. La bandelette est ensuite scellée grâce à de l'agarose chaud (inférieur à 45°C pour ne pas l'endommager) afin de chasser les bulles d'air pouvant interférer lors de la migration. Le gel est prêt pour la seconde dimension.

La cassette est alors placée dans la cuve Ettan DALT II, les 2 tampons de migration commerciaux anode et cathode sont introduits dans le système (la partie contenant la bandelette baigne dans le tampon cathode, le reste du gel dans le tampon anode) puis soumise à un programme électrique en 2 étapes : 0.5W par gel pendant 2 heures puis 2.5W par gel pendant 14 heures à 25°C (température maintenue grâce à un système de réfrigération intégré). Les protéines vont migrer dans le gel de façon inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. La migration est visible grâce au bleu de bromophénol introduit dans la préparation de l'échantillon (front de migration).

Après la seconde dimension, le gel est conservé dans une solution de fixation (15% éthanol et 7.5% acide acétique en eau bidistillée) qui préserve l'intégrité des fluorophores, en attendant d'être scanné.

#### 4.4°) Scan des gels et analyse différentielle

Le gel fixé est scanné dans un scanner Typhoon 9400 réglé avec une résolution spatiale de 100µm (réglage le plus sensible). 3 images pour chaque gel sont générées par excitation à 488nm, 532nm et 633nm (longueurs d'onde d'excitation de Cy2, Cy3 et Cy5 respectivement) et par émission à 520nm, 610nm et 670nm (longueurs d'onde d'émission de Cy2, Cy3 et Cy5 respectivement).

Les images obtenues sont ensuite chargées dans le logiciel Decyder 2D Differential Analysis v7.0. Ce logiciel contient 3 modules d'analyse : un premier module d'analyse différentielle pour un seul gel (module DIA), un second module d'analyse de variations biologiques entre plusieurs gels (module BVA) et un module d'analyse étendue permettant de réaliser un groupement des échantillons grâce à une méthode d'analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique (module EDA).

La DIA est employée en premier lieu, son algorithme co-détecte les spots correspondant aux protéines dans les 3 images générées pour chaque gel (Cy2, Cy3 et Cy5), puis réalise une quantification relative des spots par calcul du rapport suivant :

$$\boxed{\frac{\text{Cy3}}{\text{Cy2}} \text{ versus } \frac{\text{Cy5}}{\text{Cy2}}}$$

Ce rapport nous renseigne sur l'abondance de chaque protéine détectée dans les 2 échantillons chargés sur le gel. Une fois tous les gels d'une même expérience analysés séparément en DIA, les données sont transférées dans le module BVA.

Le module BVA analyse tous les gels d'une même expérience en cherchant des correspondances entre spots d'un gel à l'autre. Cette étape permet de comparer quantitativement l'expression des protéines entre tous les gels. Un fichier global regroupant toutes les correspondances identifiées entre les images analysées en DIA, ainsi que les valeurs statistiques de changement d'expression des protéines, est alors

créée. L'utilisateur peut, à tout moment, introduire une notion de groupes expérimentaux (exemple : fraction d'éjection inférieure à 40% *versus* fraction d'éjection supérieure à 60%), cependant le module BVA permet de réaliser uniquement une analyse statistique univariée, c'est-à-dire sur la base d'une seule variable expérimentale. Pour la présente étude, nous n'avons introduit aucun paramètre de groupe avant les analyses protéomiques, c'est pourquoi nous avons appliqué une analyse statistique dite multivariée grâce à l'utilisation du troisième module de ce logiciel, l'EDA.

Le module EDA utilise les données générées par le module BVA pour produire une statistique multivariée par analyse en composantes principales et classification hiérarchique. L'ACP permet de filtrer les valeurs aberrantes et de nous donner une vue d'ensemble des données ; la classification hiérarchique met en évidence un ou plusieurs motifs protéiques que nous pouvons ensuite utiliser pour grouper les échantillons.

Les spots à l'origine du groupement sont marqués comme protéines d'intérêt puis sélectionnés pour être identifiés par spectrométrie de masse.

## 5°) Digestion tryptique et spectrométrie de masse

La sélection des spots d'intérêt se fait grâce au logiciel Decyder 2D Differential Analysis v7.0. Le gel sélectionné pour l'identification est cartographié, chaque spot sélectionné est décrit par des coordonnées spatiales. Le gel est ensuite placé dans une station automatisée (Ettan Spot Handling Workstation, **Figure 16**) qui va réaliser l'excision, la digestion tryptique (fragmentation peptidique) et l'hybridation sur cible MALDI/TOF-TOF (Applied Biosystems, Carlsbad, USA, **Figure 16**).



**Figure 16 :** Ettan Spot Handling Workstation et cible MALDI TOF (source : <http://www.gelifesciences.com/> et <http://www.appliedbiosystems.com/> respectivement)

L'analyse des cibles est réalisée avec l'appareil 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Cet appareil est un spectromètre de masse couplant une source de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) avec 2 analyseurs à temps de vol (MALDI TOF/TOF) et permet de réaliser une analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les peptides sont co-cristallisés sur une cible avec une matrice de nature acide à forte absorption dans l'ultraviolet, ce qui favorisera l'ionisation des biomolécules. Une irradiation laser est appliquée, les peptides sont ionisés et passent par un premier analyseur où ils sont accélérés par une tension électrique de valeur connue, le temps de vol dans ce champ électrique est alors mesuré et nous obtenons l'empreinte de masse peptidique du/des peptide(s) précurseur(s). Cette empreinte est ensuite affinée en fragmentant chaque précurseur par collision avec un gaz inerte puis en les transférant dans un second analyseur à temps de vol.

Après détection des données, l'identification est réalisée grâce au logiciel GPS Explorer v3.6 (Applied Biosystems), qui contient le moteur de recherche Mascot (Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) couplé à l'algorithme MOWSE, en utilisant la base de données SWISSPROT (version 20100924 avec 519538 séquences, taxonomie *Homo sapiens*). Lors de la spectrométrie de masse, les peptides peuvent subir des modifications chimiques dues à l'atmosphère, à la technique d'hybridation, etc. Ces modifications sont introduites dans le logiciel par l'utilisateur, ici nous avons défini les modifications suivantes : carboxyamidométhylation des cystéines, oxydation des méthionines et des tryptophanes. Les paramètres d'identification sont

définis de la manière suivante : 150 ppm pour la masse du précurseur et 0.75 Da pour la masse des fragments. L'identification des protéines est confirmée lorsque le score MOWSE est obtenu avec une probabilité  $p < 0.01$ .

## **6°) Mesure des marqueurs biochimiques**

### **6.1°) Chimie et immunochimie clinique**

L'activité de la Créatine Phosphokinase (CPK) ainsi que les taux plasmatiques de troponine T (TnT) et d'haptoglobine (Hp) sont mesurées dans les échantillons de plasma de patients grâce aux appareils de mesure automatisés Roche Cobas c501, e601 et 6000 respectivement (Roche), en accord avec les instructions de Roche validée par la Fédération Internationale de Chimie Clinique et Médecine de Laboratoire (IFCC). Ces mesures ont été effectuées par le laboratoire de biologie médicale du Centre Hospitalier de Luxembourg. Les limites de détection des tests sont 0.01µg/L pour TnT et 0.1g/L pour Hp. Le kit utilisé pour la détection de l'Hp reconnaît les 3 isoformes de la protéine  $\alpha 1-\alpha 1$ ,  $\alpha 2-\alpha 1$ ,  $\alpha 2-\alpha 2$ .

### **6.2°) Dosage immuno-enzymatique de MMP-9 et TIMP-1**

TIMP-1 et MMP-9 (zymogène et forme active) sont mesurés dans le plasma par ELISA grâce aux kits Quantikine® Human total TIMP-1 et MMP-9 (R&D Systems) selon les instructions du fournisseur.

La procédure employée est identique à celle utilisée dans les études MMP-9 et TLR4, avec comme seule différence la dilution du plasma d'un facteur 40. Parallèlement à la lecture des échantillons, une gamme d'étalonnage est réalisée par dilution en cascade de TIMP-1 ou MMP-9 recombinants fournis dans les kits.

L'absorbance est ensuite lue à 450nm dans un spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH). La droite d'étalonnage est établie par régression linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. La limite de détection est de 80 pg/ml pour TIMP-1 et 156 pg/ml pour MMP-9.

## 7°) Analyse statistique

Les analyses protéomiques ont été conduites avec le logiciel Decyder 2D Differential Analysis v7.0, les spots sélectionnés ont été soumis à une analyse en composantes principales et une classification hiérarchique pour mettre en évidence un ou plusieurs motifs protéiques utilisés ensuite pour grouper les échantillons. Cette étape d'analyse a été conduite de manière aveugle, sans tenir compte de l'historique médical des patients. Avant de réaliser l'identification des protéines, nous avons exclu les protéines non présentes dans au moins 50% des images générées. Les protéines sélectionnées pour identification sont présentes dans au moins 50% des images générées avec une analyse de la variance (ANOVA) ayant une valeur  $p < 0.05$ .

Toutes les analyses suivantes ont été réalisées avec le logiciel SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., San José, USA). La normalité des données est évaluée par le test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entre groupes ont été réalisées avec le test  $t$  de Student (distribution gaussienne) ou le test Mann-Whitney (distribution non gaussienne). L'analyse de la variance est effectuée pour les comparaisons de groupes multiples. Le test de Pearson a été employé pour évaluer les corrélations entre marqueurs plasmatiques. La valeur pronostique d'un biomarqueur potentiel est évaluée en calculant l'aire sous la courbe (AUC) de caractéristique de fonctionnement du récepteur (ROC). Tous les tests employés sont à 2 dimensions, nous considérons la valeur  $p < 0.05$  comme significative.

L'étude des facteurs cliniques liés à la dysfonction ventriculaire gauche est réalisée en utilisant un modèle linéaire mixte avec la fraction d'éjection du ventricule gauche définie comme variable observée dépendante et les données anthropométriques et paramètres cliniques définis comme variables indépendantes (fixe ou explicative), suivie par des tests post-hoc de Bonferroni le cas échéant.

# Résultats

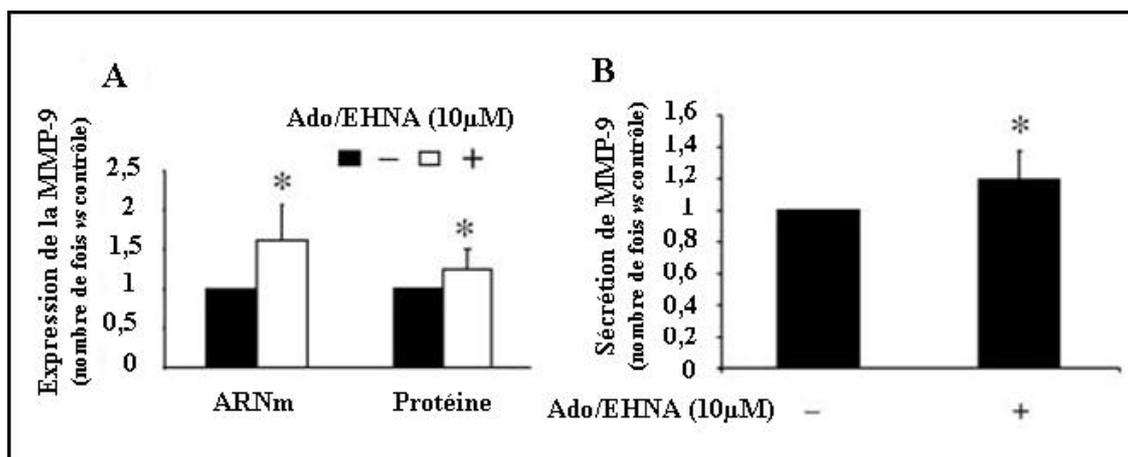
## Chapitre 1 : l'activation du récepteur à l'adénosine A3 stimule la sécrétion de MMP-9 par les macrophages

### 1°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages

Des études précédemment menées par l'équipe du laboratoire ont révélé que l'adénosine est capable de diminuer la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains<sup>16</sup>. Les neutrophiles constituent la première vague cellulaire recrutée au niveau de l'infarctus. Nous avons choisi d'étudier les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 chez les macrophages qui représentent la seconde vague cellulaire recrutée au niveau de la zone infarctée.

#### 1.1°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains

Afin d'évaluer la production de MMP-9 chez le macrophage primaire humain, nous avons extrait des monocytes du sang de volontaires sains et de patients souffrant d'un infarctus du myocarde que nous avons différencié en macrophages primaires.



**Figure 17 :** l'adénosine augmente l'expression de la MMP-9 au niveau de l'ARNm et de la protéine chez le macrophage primaire issu de volontaires sains et de patients IM.

*L'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages primaires. (A) Des monocytes extraits du sang de volontaires sains ont été différenciés en macrophages par 50ng/mL de M-CSF pendant 7 jours, avant d'être traités par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 24 heures. Le niveau d'expression de l'ARNm MMP-9 a été évalué par qPCR et le niveau d'expression de la protéine MMP-9 a été évalué par ELISA sur les milieux de culture conditionnés. L'adénosine entraîne une augmentation d'expression de la MMP-9 tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine et sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=8). \*  $p < 0.05$  versus contrôle. (B) Des monocytes extraits du sang de patients IM ont été différenciés en macrophages par 50ng/mL de M-CSF pendant 7 jours, avant d'être traités par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 24 heures. La production de MMP-9, évaluée par zymographie dans les milieux conditionnés, est augmentée par l'adénosine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=4). \*  $p < 0.05$  versus contrôle.*

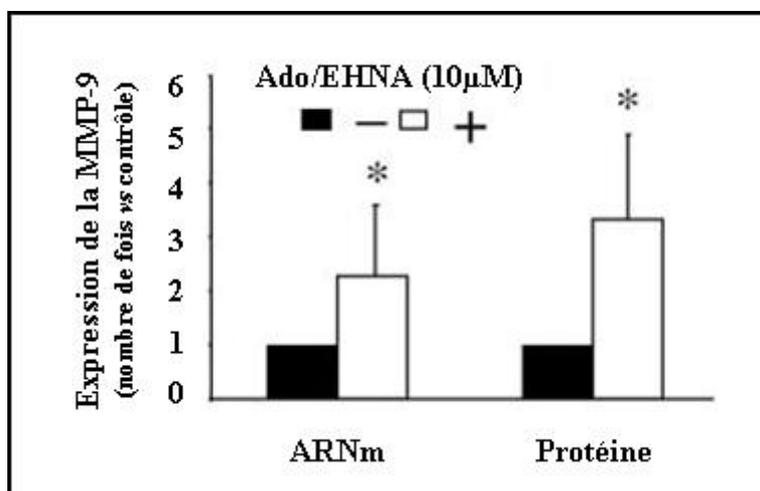
Les macrophages stimulés par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 24 heures produisent plus de MMP-9, tant au niveau ARNm (+70%) qu'au niveau protéine (+20%) que les macrophages non traités (**Figure 17A**). L'augmentation de sécrétion de MMP-9 de 20% observée sur les macrophages primaires issus de volontaires sains est reproduite chez les macrophages issus de patients IM, comme évalué par zymographie sur les milieux de culture conditionnés (**Figure 17B**).

Ces résultats montrent que l'adénosine est capable de stimuler la production et la sécrétion de MMP-9 par les macrophages primaires humains, aussi bien issus de volontaires sains que de patients souffrant d'un IM.

### **1.2°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages issus de la lignée THP-1**

Nous avons ensuite étudié les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par la lignée pro-monocytaire THP-1. Ces cellules peuvent être différenciées en macrophages par l'ajout de PMA pendant au moins 24 heures et fournissent de grandes quantités de matériel (ARNm, protéines) nécessaire aux expériences mécanistiques.

Nous avons étudié les effets de l'adénosine sur la synthèse d'ARNm MMP-9 par qPCR et sur la sécrétion de la protéine MMP-9 par ELISA par des monocytes THP-1 différenciés en macrophages (**Figure 18**).



**Figure 18 :** l'adénosine augmente l'expression de la MMP-9 au niveau ARNm et protéine chez le macrophage THP-1

*L'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1. Les monocytes THP-1 sont traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages par l'ajout de 150nM de PMA pendant 48 heures. Le niveau d'expression de l'ARNm MMP-9 a été évalué par qPCR et rapporté au gène de référence  $\beta$ -actine. Le niveau d'expression de la protéine MMP-9 a été évalué par ELISA sur les milieux de culture conditionnés. L'adénosine entraîne une augmentation d'expression de la MMP-9 tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=6). \* p<0.05 versus contrôle.*

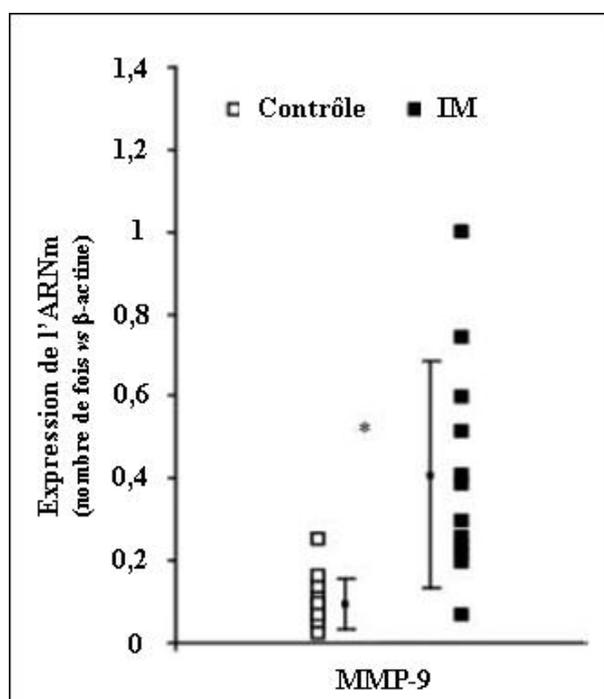
Les expériences montrent une augmentation significative de la synthèse d'ARNm MMP-9 par l'adénosine (2 fois *versus* contrôle), qui corrèle avec une augmentation de la sécrétion de protéine dans le milieu extracellulaire (3 fois *versus* contrôle). L'augmentation de la quantité de transcrite MMP-9 par l'adénosine suggère l'existence d'une régulation au niveau de la transcription.

Le choix de la concentration d'adénosine de 10 $\mu$ M et du temps de différenciation des monocytes en macrophages a été dicté par des expériences cinétiques et de dose-réponse, indiquant un effet optimum de l'adénosine sur la production de MMP-9 à partir de 1 $\mu$ M et à partir de 18 heures de différenciation (données présentées en **Annexe 1**). L'ajout d'EHNA permet d'augmenter la demi-vie de l'adénosine dans le milieu extracellulaire et favorise également la contribution de l'adénosine endogène.

Nous avons également observé que l'adénosine ne régule pas l'expression des inhibiteurs endogènes de la MMP-9 RECK et TIMP-1, ce qui semble indiquer qu'elle ne régule pas la synthèse de MMP-9 via un effet sur ses inhibiteurs endogènes (données présentées en **Annexe 1**).

### 1.3°) Expression de la MMP-9 par les cellules du sang total

Nous avons ensuite mesuré le niveau d'expression de l'ARNm MMP-9 par qPCR à partir des cellules du sang total de volontaires sains et de patients souffrant d'un infarctus du myocarde (**Figure 19**).



**Figure 19 :** les leucocytes extraits du sang de patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm MMP-9 que les leucocytes extraits de volontaires sains

*Les leucocytes extraits du sang de patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm MMP-9 que les leucocytes extraits de volontaires sains. Les échantillons de sang de volontaires sains et de patients souffrant d'un infarctus du myocarde sont prélevés à l'aide du système PAXgene® Blood RNA. Les volontaires sains sont représentés par les carrés ouverts (contrôle), les patients avec infarctus du myocarde sont représentés par les carrés pleins (IM). Le niveau d'ARNm MMP-9 a été évalué par PCR quantitative. Les patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm MMP-9 que les volontaires sains. Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=12). \*  $p < 0.0005$  versus contrôle.*

Les cellules sanguines de patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm MMP-9 que les cellules obtenues à partir du sang de volontaires sains. En tenant compte que l'adénosine est massivement relarguée au niveau du cœur après infarctus du myocarde <sup>13, 15</sup>, ces résultats suggèrent que l'adénosine provoque une augmentation de l'ARNm MMP-9 par les monocytes/macrophages au niveau du cœur post-infarctus du myocarde.

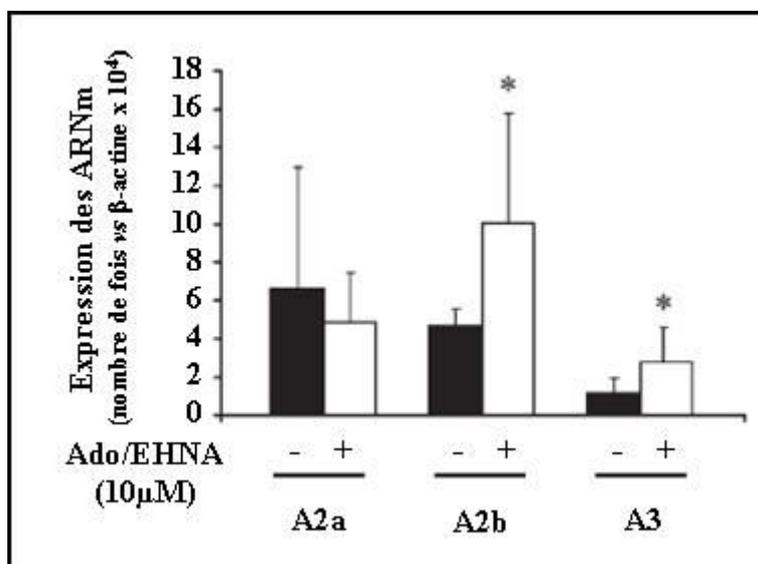
## **2°) Implication des récepteurs à l'adénosine dans la production accrue de MMP-9 par les macrophages**

Nous avons voulu déterminer quel(s) type(s) de récepteur(s) à l'adénosine est (sont) impliqué(s) dans l'effet de l'adénosine sur la MMP-9. Une précédente étude, menée au sein de notre laboratoire, a mis en évidence l'implication du récepteur A2A dans la diminution de la production de MMP-9 chez les granulocytes neutrophiles <sup>16</sup>.

Après avoir étudié l'expression des 4 types de récepteurs à l'adénosine chez les macrophages THP-1, nous avons procédé par activation sélective de ces récepteurs à l'aide d'une approche pharmacologique (emploi d'agonistes spécifiques de chacun des récepteurs exprimés) et inhibition sélective de ces récepteurs à l'aide d'une approche moléculaire (emploi de siARN spécifiques de chacun des récepteurs exprimés). Les résultats de cette étude sont présentés dans les sections suivantes.

## 2.1°) Expression des récepteurs à l'adénosine

L'expression des récepteurs à l'adénosine a été étudiée au niveau transcriptionnel en qPCR chez les macrophages THP-1 (**Figure 20**).



**Figure 20 :** l'adénosine induit une augmentation d'expression des ARNm A2B et A3 chez le macrophage THP-1

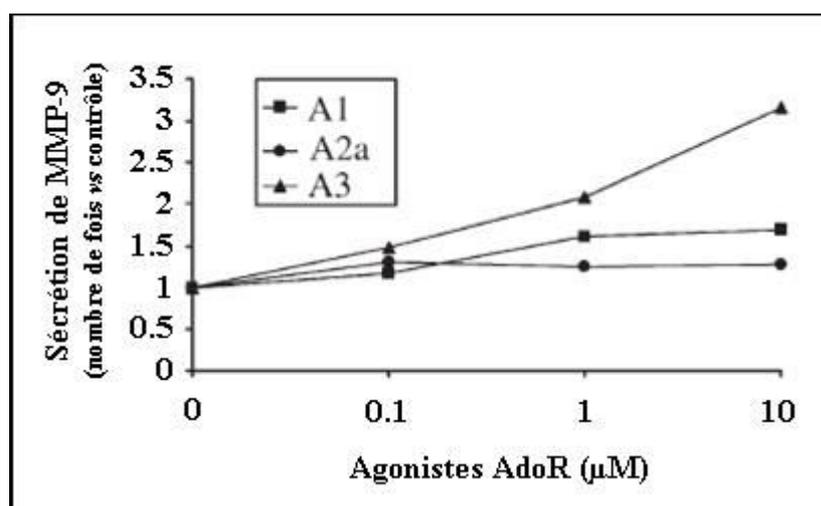
*L'expression des ARNm A2B et A3 est augmentée par l'adénosine chez le macrophage THP-1. Les monocytes THP-1 ont été pré-traités ou non par 10μM d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages pendant 48 heures par l'ajout de 150nM de PMA. L'expression des ARNm A2A, A2B et A3 a été mesurée par qPCR et rapportée à l'expression du gène de référence β-actine. L'adénosine entraîne une augmentation de l'expression des ARNm A2B et A3 chez les macrophages THP-1. L'expression de l'ARNm A2A n'est pas affectée par le traitement adénosine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=6). \* p<0,05 versus contrôle.*

Les résultats obtenus révèlent que les récepteurs majoritairement exprimés par les macrophages THP-1 sont les récepteurs de type A2. Le récepteur A1 n'a pas été détecté lors de nos expériences.

L'adénosine ne modifie pas l'expression de l'ARNm du récepteur A2A mais induit une augmentation d'expression des ARNm A2B et A3 (plus de 2 fois *versus* contrôle). Nous avons ensuite utilisé une approche pharmacologique pour déterminer quel(s) récepteur(s) est(sont) impliqué(s) dans l'augmentation de production de MMP-9 par les macrophages.

## 2.2°) Effet d'agonistes des récepteurs à l'adénosine

L'activation pharmacologique des récepteurs à l'adénosine a été réalisée par l'emploi d'agonistes spécifiques des types de récepteurs A1, A2A et A3. Il n'existe à l'heure actuelle aucun agoniste spécifique commercial du récepteur A2B. Le niveau de sécrétion de la MMP-9 a été évalué par zymographie (**Figure 21**).



**Figure 21 :** l'activation du récepteur A3 stimule la production de MMP-9 par les macrophages THP-1

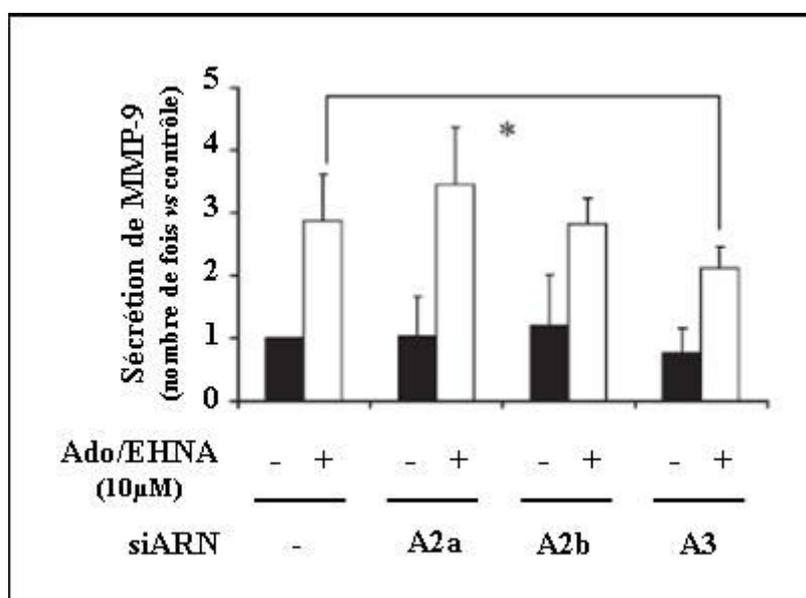
*L'activation du récepteur A3 stimule la production de MMP-9 par les macrophages THP-1. Les monocytes THP-1 ont été pré-traités ou non par 10μM de CPA (agoniste A1), 10μM de CGS21680 (agoniste A2A) ou 10μM d'IB-MECA (agoniste A3) pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages pendant 48 heures par l'ajout de 150nM de PMA La sécrétion de MMP-9 est établie dans les milieux de culture conditionnés par zymographie. L'agoniste A3 provoque une augmentation de la sécrétion de MMP-9 de façon dose-dépendante, reproduisant ainsi les effets de*

*l'adénosine. Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle sans agonistes. Cette expérience a été répétée 2 fois, la tendance est conservée.*

Les résultats obtenus indiquent que le récepteur A3 est impliqué dans l'augmentation de la production de MMP-9 par l'adénosine. L'emploi de l'agoniste spécifique de ce récepteur IB-MECA provoque une augmentation de la production de MMP-9 de la même façon que l'adénosine chez le macrophage THP-1. Nous avons également réalisé cette expérience avec des macrophages primaires et avons confirmé les résultats obtenus avec les macrophages THP-1 au niveau de l'expression de l'ARNm MMP-9 (données non présentées).

### 2.3°) Effet d'une inhibition des récepteurs à l'adénosine

L'inhibition moléculaire des récepteurs à l'adénosine a été réalisée par l'emploi de siARN ciblant spécifiquement les récepteurs A2A, A2B et A3. L'inhibition du récepteur A3 entraîne une diminution de production de MMP-9 chez les macrophages THP-1 traités par l'adénosine (**Figure 22**).



**Figure 22 :** l'inhibition sélective du récepteur A3 réduit la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez le macrophage THP-1

*L'inhibition sélective du récepteur A3 réduit la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez le macrophage THP-1. Les monocytes THP-1 ont été transfectés pendant 48 heures à l'aide de siARN spécifique des récepteurs à l'adénosine A2A, A2B et A3, puis pré-traités ou non par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages pendant 48 heures par l'ajout de 150nM de PMA. La production de MMP-9 a été mesurée par zymographie sur les milieux de culture conditionnés. L'extinction sélective du récepteur A3 réduit la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez le macrophage THP-1. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3). \* p<0,05 versus adénosine.*

## **2.4°) Conclusion**

Nous avons démontré que l'adénosine est capable de moduler l'expression de ses récepteurs au niveau transcriptionnel, notamment les récepteurs A2B et A3 chez le macrophage THP-1. Les approches pharmacologique et moléculaire employées pour activer/inhiber spécifiquement chaque type de récepteur ont révélé une implication du récepteur à l'adénosine A3 dans l'augmentation de la production de MMP-9 par les macrophages (THP-1 et primaires). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus chez les granulocytes neutrophiles obtenus dans une précédente étude au sein de notre laboratoire qui montraient une diminution de la production de MMP-9 induite par le récepteur A2A <sup>16</sup>.

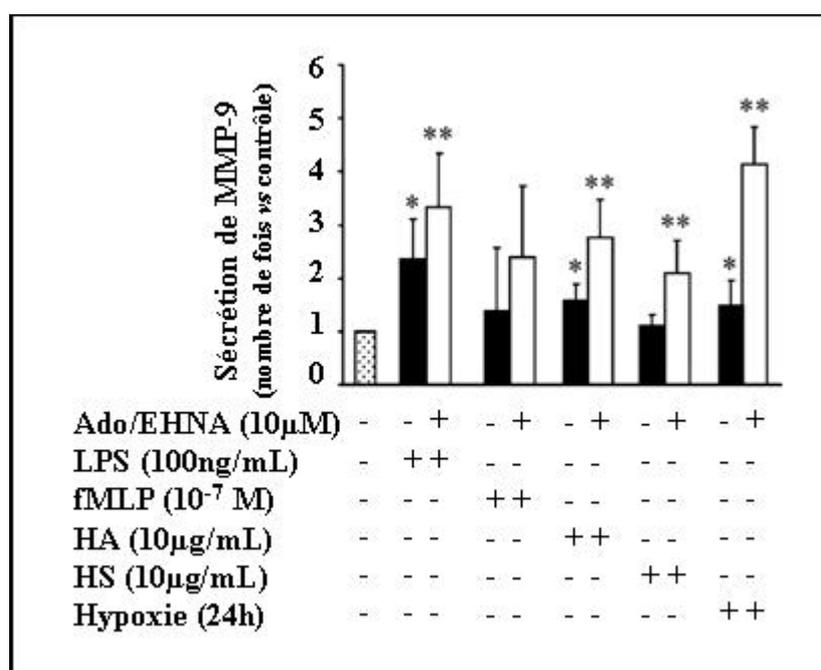
## **3°) Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages activés**

Nous avons démontré que l'adénosine est capable de moduler la synthèse de MMP-9 chez les macrophages primaires humains ou issus de la lignée promonocytaire humaine THP-1 à l'état latent. Nous avons ensuite voulu déterminer si ces effets sont également observés chez des macrophages activés par différents types de stimuli mimant les conditions présentes au niveau du cœur post-infarctus du myocarde. Pour ce faire, nous avons soumis les cellules à différents types de traitements incluant des stimulations par le lipopolysaccharide bactérien LPS, le peptide fMLP (composant inflammatoire des bactéries à Gram positives possédant des

propriétés chimio-attractives pour les granulocytes neutrophiles et les monocytes), des composants provenant de la rupture de la matrice extracellulaire tels que le hyaluronan (HA) et l'héparane sulfate (HS). Nous avons également placé les cellules en conditions hypoxiques afin de reproduire la privation en oxygène au niveau de la zone infarctée.

Les résultats montrent que le LPS, le HA et l'hypoxie induisent une production significative de MMP-9 chez le macrophage THP-1 par rapport à la condition contrôle. L'utilisation de fMLP et de HS ne provoquent pas d'effets significatifs sur la production de MMP-9 (**Figure 23**).

Lorsque les macrophages sont soumis à un pré-traitement par un mélange d'adénosine et d'EHNA, nous constatons une augmentation supérieure de la production de MMP-9 dans toutes les conditions testées. Cette augmentation est statistiquement significative sauf pour le traitement fMLP.



**Figure 23 :** l'adénosine augmente la synthèse de MMP-9 par les macrophages THP-1 activés

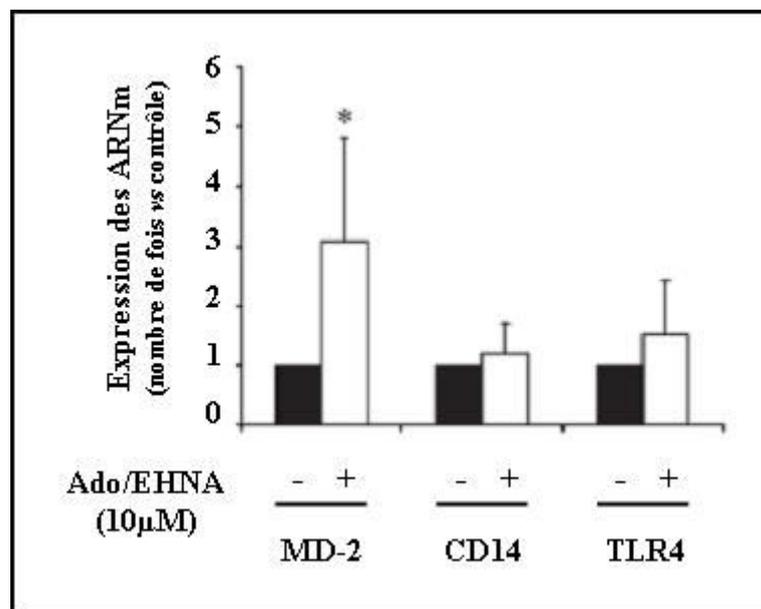
*L'adénosine augmente la synthèse de MMP-9 par les macrophages THP-1 activés. Les monocytes THP-1 sont pré-traités par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 15*

minutes avant d'être différenciés en macrophages par ajout de 150nM de PMA pendant 48 heures. 24 heures avant la fin de la différenciation, les cellules sont traitées par 100ng/mL de LPS,  $10^{-7}$ M de fMLP, 10µg/mL de HA ou 10µg/mL de HS, ou les cellules sont placées dans un environnement hypoxique (système Gaspak). La concentration de MMP-9 dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. Le LPS, le HA et l'hypoxie provoquent une augmentation de la production de MMP-9. L'adénosine potentialise cet effet. Les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0,05$  versus contrôle \*\*  $p < 0,05$  versus adénosine/EHNA.

#### 4°) Effets sur les composants du système de reconnaissance du LPS

Nous avons vu dans les expériences précédentes que l'adénosine augmente la sécrétion de MMP-9 chez les macrophages activés par le LPS. Nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait passer par une modification de l'expression de l'un ou plusieurs des acteurs du système de reconnaissance du LPS.

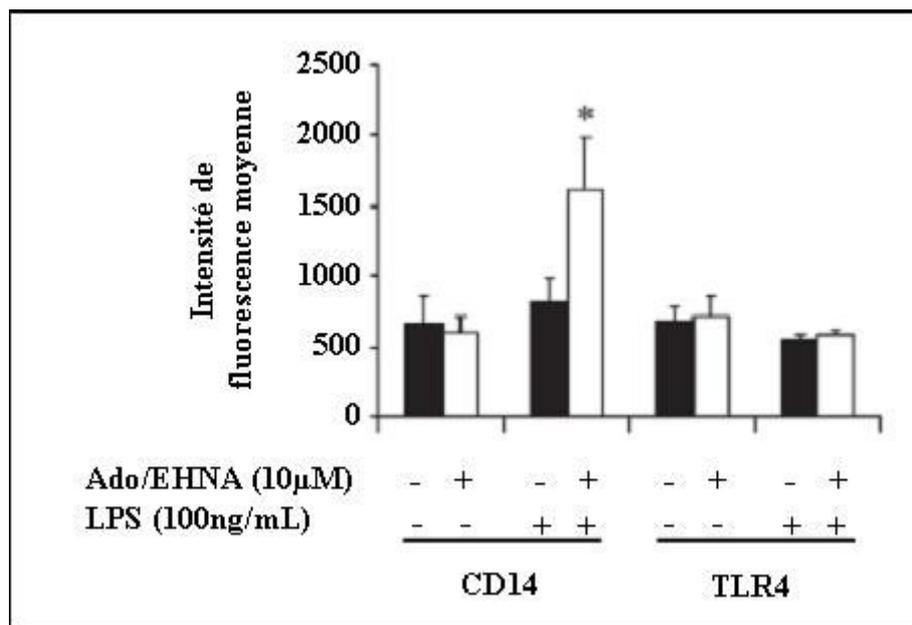
Nous avons utilisé des macrophages THP-1 et avons mesuré les effets de l'adénosine sur l'expression des ARNm MD-2, CD14 et TLR4 par PCR quantitative (**Figure 24**).



**Figure 24 :** l'adénosine accroît l'expression de l'ARNm MD-2 chez le macrophage THP-1

L'adénosine accroît l'expression de l'ARNm MD-2 chez le macrophage THP-1. Les monocytes THP-1 ont été pré-traités ou non par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages pendant 48 heures par l'ajout de 150nM de PMA. L'expression des ARNm MD-2, CD14 et TLR4 a été mesurée par qPCR et rapportée au gène de référence  $\beta$ -actine. L'adénosine entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm MD-2 chez les macrophages THP-1. Les expressions des ARNm CD14 et TLR4 ne sont pas affectés par le traitement adénosine. Les résultats sont exprimés par la moyenne des échantillons  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,01$  versus contrôle.

Nous avons ensuite mesuré les effets de l'adénosine sur l'expression de surface des récepteurs CD14 et TLR4 par cytométrie en flux (**Figure 25**).



**Figure 25 :** l'adénosine augmente l'expression de surface de CD14 chez le macrophage THP-1 activé

L'adénosine augmente l'expression de surface de CD14 chez le macrophage THP-1 activé. Les monocytes THP-1 ont été pré-traités ou non par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être différenciés en macrophages pendant 48 heures par l'ajout de 150nM de PMA. 24 heures avant la fin de leur différenciation, les

*macrophages sont stimulés par l'ajout de 100ng/mL de LPS. L'expression de surface des récepteurs CD14 et TLR4 a été mesurée par cytométrie en flux. L'adénosine entraîne une augmentation de l'expression de surface de CD14 chez les macrophages THP-1 en présence de LPS. L'expression de surface de CD14 n'est pas affectée par le traitement adénosine. L'expression de surface de TLR4 ne semble pas affectée par les traitements. Les résultats sont exprimés par les valeurs d'intensité de fluorescence moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,01$  versus contrôle.*

Les résultats obtenus révèlent un effet de l'adénosine sur l'expression des éléments du système de reconnaissance du LPS MD-2 et CD14 chez le macrophage THP-1. Le pré-traitement par l'adénosine augmente l'expression de MD-2 au niveau transcriptionnel (3 fois *versus* contrôle). L'expression de CD14 au niveau membranaire chez le macrophage stimulé par le LPS est également augmentée par l'adénosine (3 fois *versus* contrôle et LPS seul).

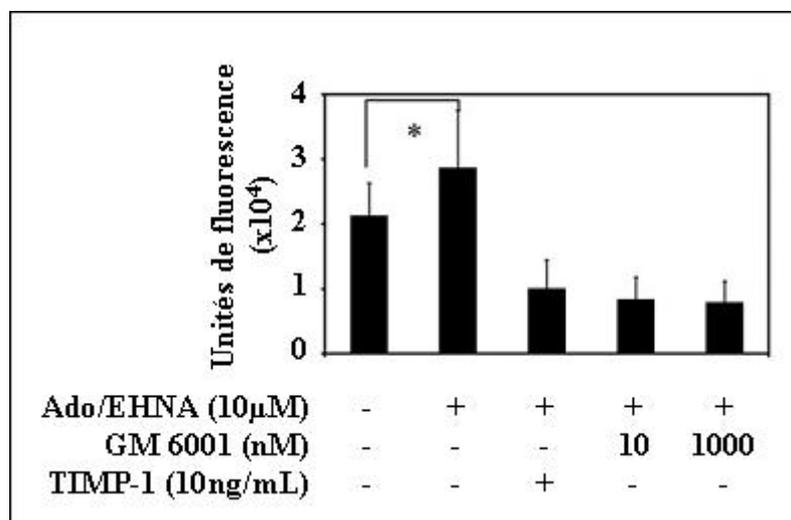
Ces données, en tenant également compte du fait que l'adénosine augmente fortement la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 activés par le LPS (**Figure 23**), suggèrent l'existence d'un mécanisme de sensibilisation des cellules aux ligands du TLR4 induit par l'adénosine via une régulation positive de certains éléments de reconnaissance du système TLR4 chez les macrophages THP-1.

## **5°) Effets de l'adénosine sur la migration des monocytes**

La capacité migratoire des monocytes est un facteur clé du remodelage ventriculaire. Lors de l'apparition d'un infarctus du myocarde, les monocytes vont progressivement s'infiltrer au cœur de la zone lésée en suivant un gradient de facteurs chimiotactiques, incluant la protéine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et son récepteur cellulaire CCR-2 (Récepteur aux chimiokines 2). L'infiltration requiert une dégradation contrôlée de la MEC grâce aux MMPs et notamment la MMP-9. Une fois sur place, les monocytes se différencient en macrophages et déclenchent les mécanismes immunitaires.

Nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pourrait augmenter la capacité migratoire des monocytes vers un gradient de MCP-1 en augmentant la synthèse de MMP-9. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle de migration

en Transwell avec des monocytes THP-1 traités avec de l'adénosine et traités ou non avec des inhibiteurs de la MMP-9 (synthétique : GM6001, endogène : TIMP-1). Les résultats de cette expérience sont présentés **Figure 26**.



**Figure 26 :** l'adénosine augmente la migration des monocytes vers un gradient de MCP-1

*L'adénosine augmente la migration des monocytes vers un gradient de MCP-1. Les monocytes THP-1 sont traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 24 heures puis traités ou non pendant 30 minutes avec les inhibiteurs de la MMP-9 suivants : GM 6001 (10 et 1000nM) ou TIMP-1 (10ng/mL) avant d'êtreensemencés dans le compartiment supérieur d'un Transwell recouvert de gélatine B. Le compartiment inférieur contient 10ng/mL de MCP-1. La migration est évaluée après 24 heures par mesure en fluorescence grâce au kit CyQuant GR®. L'adénosine augmente la capacité migratoire des monocytes THP-1 vers un gradient de MCP-1, cet effet est fortement réduit par les inhibiteurs de la MMP-9. Les résultats sont exprimés par les valeurs d'intensité de fluorescence moyenne  $\pm$  SD (n=5). \* p<0,05 versus contrôle.*

L'adénosine augmente la migration des monocytes vers un gradient de MCP-1. L'ajout des inhibiteurs de la MMP-9, GM 6001 et TIMP-1, réduit fortement la migration, indiquant que cet effet a lieu via la production de MMP-9.

Nous avons montré que l'adénosine est capable de moduler le chimiotactisme des monocytes *via* une action sur le système CCR-2/MCP-1. Il apparaît que

l'expression de l'ARNm CCR2 est augmentée chez le monocyte THP-1 et réduite chez le macrophage THP-1. De plus, l'expression de surface de CCR2 est également réduite chez le macrophage THP-1 (données présentées en **Annexe 1**).

Lorsque les monocytes sont différenciés en macrophages, l'expression de CCR2 est réduite par l'adénosine, au niveau transcriptionnel et membranaire. Cette susceptibilité distincte suggère que l'adénosine est capable de promouvoir la migration des monocytes jusqu'à la zone lésée, où ils se différencient, puis de réguler négativement le chimiotactisme des macrophages différenciés afin de localiser la réaction inflammatoire.

## **Chapitre 2 : l'adénosine réduit l'expression de surface du récepteur TLR4 et l'inflammation en réponse au lipopolysaccharide et aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque**

### **1°) Effets de l'adénosine sur la voie du récepteur TLR4**

L'induction d'une réponse inflammatoire au niveau du myocarde suite à un infarctus est associée avec le développement du remodelage du ventricule gauche. Le récepteur de l'immunité innée TLR4 a été largement décrit comme étant un médiateur de l'inflammation. Son expression est augmentée dans le cœur en état d'insuffisance cardiaque <sup>9</sup>.

De plus, l'activation de TLR4 est liée à la dégradation de la MEC et à la synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires participant ainsi à l'extension du remodelage maladaptatif post-infarctus <sup>10</sup>.

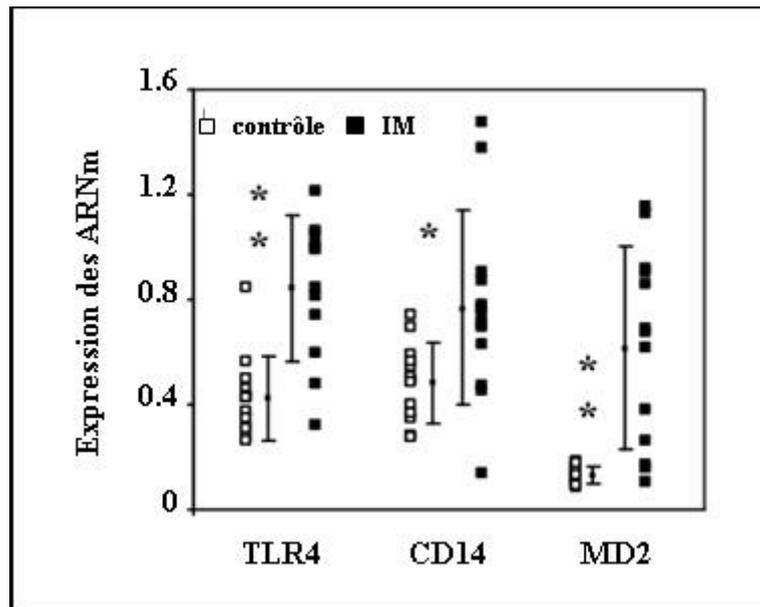
L'adénosine possède des propriétés cardioprotectrices et anti-inflammatoires et nos résultats obtenus sur la modulation de la synthèse de MMP-9 suggèrent un rôle de ce nucléoside dans le remodelage du ventricule gauche ainsi que dans la restauration de la fonction cardiaque.

Dans l'étude précédente, nous avons montré que l'activation de TLR4 induit la production de MMP-9, et que l'adénosine est capable de moduler l'expression de certains éléments du système de reconnaissance du LPS chez le macrophage THP-1.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'adénosine module la réaction inflammatoire en agissant sur l'expression du récepteur TLR4 dans les cellules inflammatoires et particulièrement les macrophages primaires activés.

#### **1.1°) Expression des éléments de reconnaissance du LPS par les cellules du sang total**

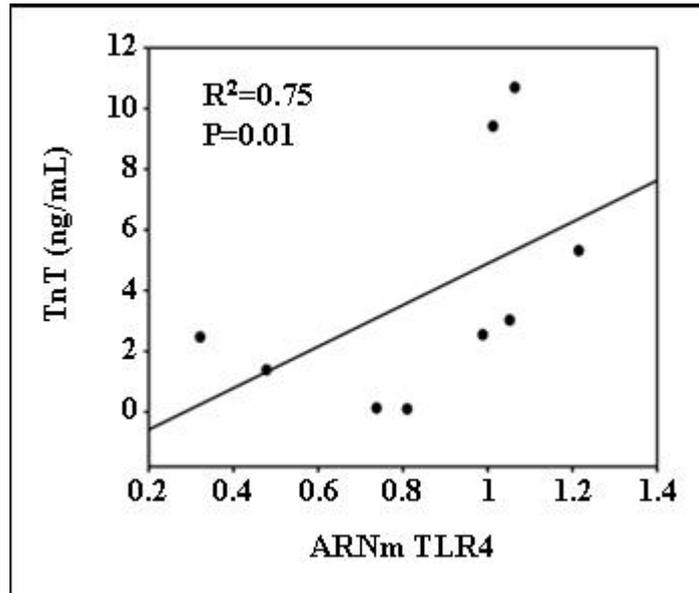
Dans un premier temps, nous avons évalué le niveau d'expression des éléments du système de reconnaissance du LPS dans les cellules du sang total de volontaires sains et de patients IM par qPCR (**Figure 27**).



**Figure 27 :** les ARNm du système de reconnaissance du LPS sont plus exprimés dans les cellules du sang total de patients souffrant d'un infarctus du myocarde par rapport aux volontaires sains

*Les patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm TLR4, CD14 et MD2 que les volontaires sains. Les échantillons de sang de volontaires sains et de patients souffrant d'un infarctus du myocarde sont prélevés à l'aide du système PAXgene® Blood RNA. Les volontaires sains sont représentés par les carrés ouverts (contrôle), les patients avec infarctus du myocarde sont représentés par les carrés pleins (IM). Les niveaux d'expression des ARNm TLR4, CD14 et MD2 ont été évalués par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=12). \*  $p < 0.01$  versus contrôle \*\* $p < 0.0005$  versus contrôle.*

Les cellules du sang total de patients souffrant d'un infarctus du myocarde expriment plus d'ARNm TLR4, CD14 et MD2 par rapport aux cellules de volontaires sains, ce qui suggère un rôle du système TLR4 dans l'inflammation post-IM. De plus, nous avons montré que le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 est positivement corrélé avec le taux plasmatique de troponine T (marqueur de dommages myocardiques, **Figure 28**).



**Figure 28 :** le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 est positivement corrélé avec le taux plasmatique de troponine T chez les patients IM

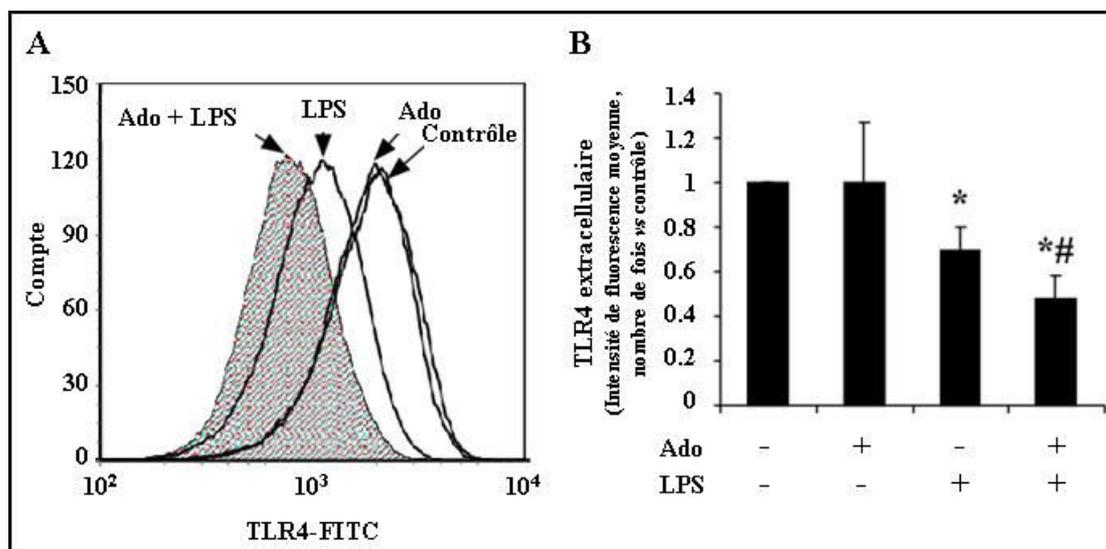
*Le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 est positivement corrélé avec les valeurs de TnT. Les échantillons de sang de patients souffrant d'un infarctus du myocarde sont prélevés à l'aide du système PAXgene® Blood RNA. Le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 a été évalué par PCR quantitative. Le taux plasmatique de Troponine T (TnT) est mesuré dans les échantillons de plasma de patients grâce à l'appareil de mesure automatisé Roche Cobas e601. Les résultats de PCR quantitative sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. Les mesures de TnT sont disponibles pour 9 patients. Le coefficient de corrélation ainsi que la valeur p sont indiqués sur la figure.*

### 1.2°) Effets de l'adénosine sur l'expression de TLR4 par les macrophages

Nous avons utilisé un modèle d'inflammation *in vitro* afin d'étudier les effets de l'adénosine sur l'expression de TLR4. Les cellules utilisées sont des macrophages primaires issus du sang de volontaires sains ou de patients IM, ainsi que des macrophages issus de la lignée pro-monocytaire THP-1. L'expression de TLR4 a été étudiée à 3 niveaux : expression de surface, transcriptionnel et protéine totale.

### 1.2.1°) Expression de surface

Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages primaires. L'expression de surface de TLR4 a été déterminée par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 29**.



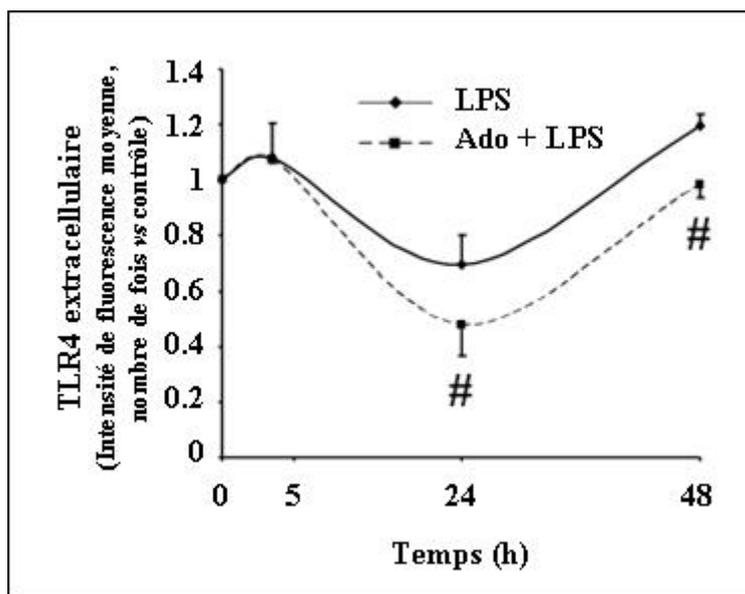
**Figure 29 :** l'adénosine diminue l'expression de surface du récepteur TLR4 chez les macrophages primaires activés par le LPS

*Le LPS réduit l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage primaire, cette diminution est augmentée par le pré-traitement adénosine/EHNA. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. (A) Histogramme représentatif d'une expérience. Le niveau d'expression de surface de TLR4 est mesuré par cytométrie en flux. (B) Le LPS réduit l'expression de surface de TLR4, cette diminution est augmentée par le pré-traitement adénosine/EHNA. Les résultats sont exprimés en valeurs d'intensité de fluorescence moyenne  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0,05$  versus contrôle, #  $p < 0,05$  versus LPS.*

Les résultats obtenus montrent que le LPS seul est capable de réduire l'expression de surface du TLR4, suggérant la présence d'un mécanisme de limitation

de la réaction inflammatoire. L'adénosine seule n'a pas d'effet sur l'expression de surface de TLR4 à 24 heures mais est capable de diminuer de 50% l'expression du TLR4 chez le macrophage activé.

Nous avons étudié la régulation de l'expression de surface du TLR4 par l'adénosine en fonction du temps (**Figure 30**).



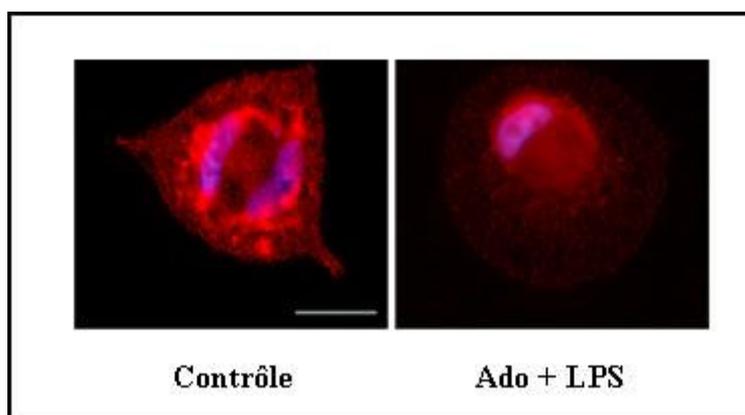
**Figure 30 :** l'adénosine potentialise la diminution de l'expression de surface de TLR4 induite par le LPS chez les macrophages primaires activés

*L'expression de surface de TLR4 est réduite par le LPS à 24 heures avant de retourner à son niveau basal à 48 heures. Cette diminution est augmentée par le pré-traitement adénosine/EHNA. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS jusqu'à 48 heures. Le niveau d'expression de surface de TLR4 est mesuré par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en valeurs d'intensité de fluorescence moyenne  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). #  $p < 0,05$  versus LPS.*

Les résultats observés indiquent que la diminution d'expression de surface de TLR4 est maximale après 24 heures d'exposition au LPS, puis est restaurée après 48

heures. En présence d'adénosine, la réduction de l'expression de surface de TLR4 est augmentée, aussi bien à 24 qu'à 48 heures.

Nous avons également observé, par immunofluorescence chez le macrophage THP-1, que l'adénosine est capable de réduire l'expression de surface de TLR4 après 24 heures d'activation par le LPS (**Figure 31**).

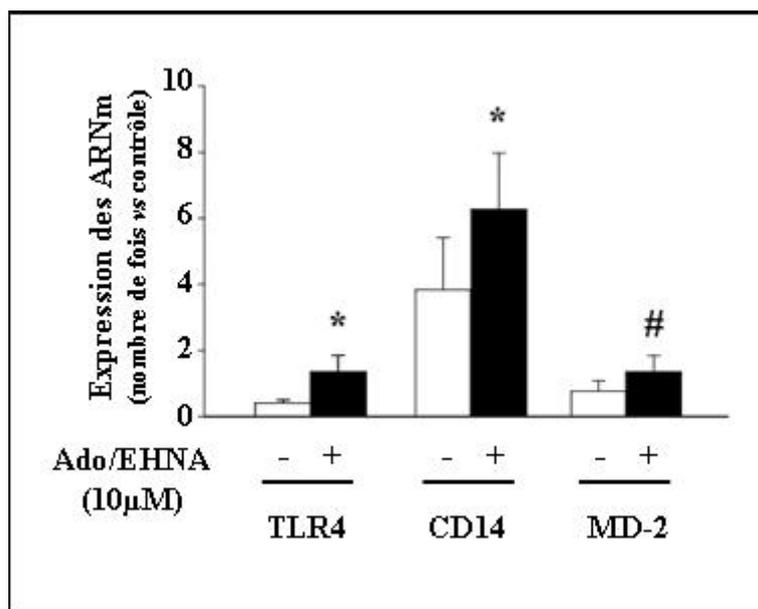


**Figure 31** : l'adénosine réduit l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1 activé

*L'adénosine diminue l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1 activé versus contrôle. Les monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages pendant 24 heures par l'ajout de 150nM de PMA, puis pré-traités ou non par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés pendant 24 heures par l'ajout de 100ng/mL de LPS. L'expression de surface de TLR4 a été évaluée par immunofluorescence. Les images présentées sont choisies aléatoirement parmi 3 images par condition. Barre d'échelle : 20 $\mu$ m.*

### 1.2.2°) Expression des ARNm du système TLR4

Nous avons mis en évidence un effet de l'adénosine sur l'expression de surface du récepteur TLR4 chez les macrophages activés. Nous avons ensuite voulu caractériser un effet au niveau transcriptionnel sur les composants du système TLR4. Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages primaires (**Figure 32**).

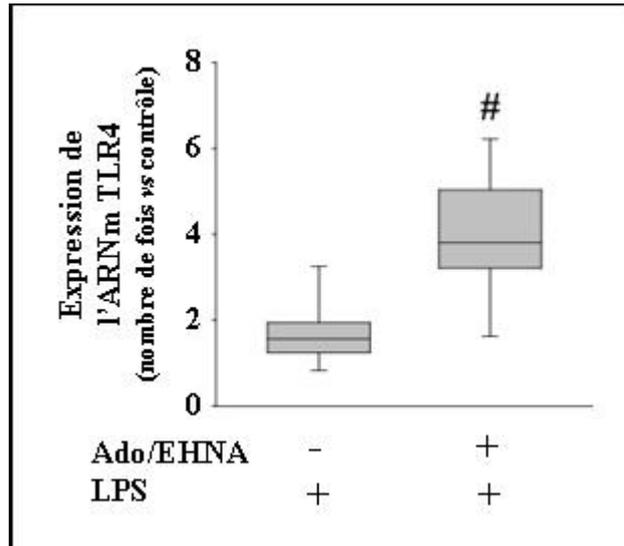


**Figure 32 :** l'adénosine augmente l'expression des ARNm du système TLR4 chez les macrophages primaires activés

*L'adénosine augmente l'expression des ARNm du système TLR4 chez les macrophages primaires activés. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10µM d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. Le niveau d'expression des ARNm TLR4, CD14 et MD2 est mesuré par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=8). \*  $p < 0.01$  versus contrôle #  $p < 0.001$  versus contrôle.*

L'adénosine régule positivement l'expression des ARNm du système TLR4 chez le macrophage primaire activé. Nous observons une augmentation de l'expression de l'ARNm TLR4 de 3 fois par rapport au contrôle.

Nous avons également réalisé des PCR quantitatives sur des macrophages isolés du sang de patients IM et pré-traités par 10µM d'adénosine/EHNA avant d'être activés par le LPS (**Figure 33**).



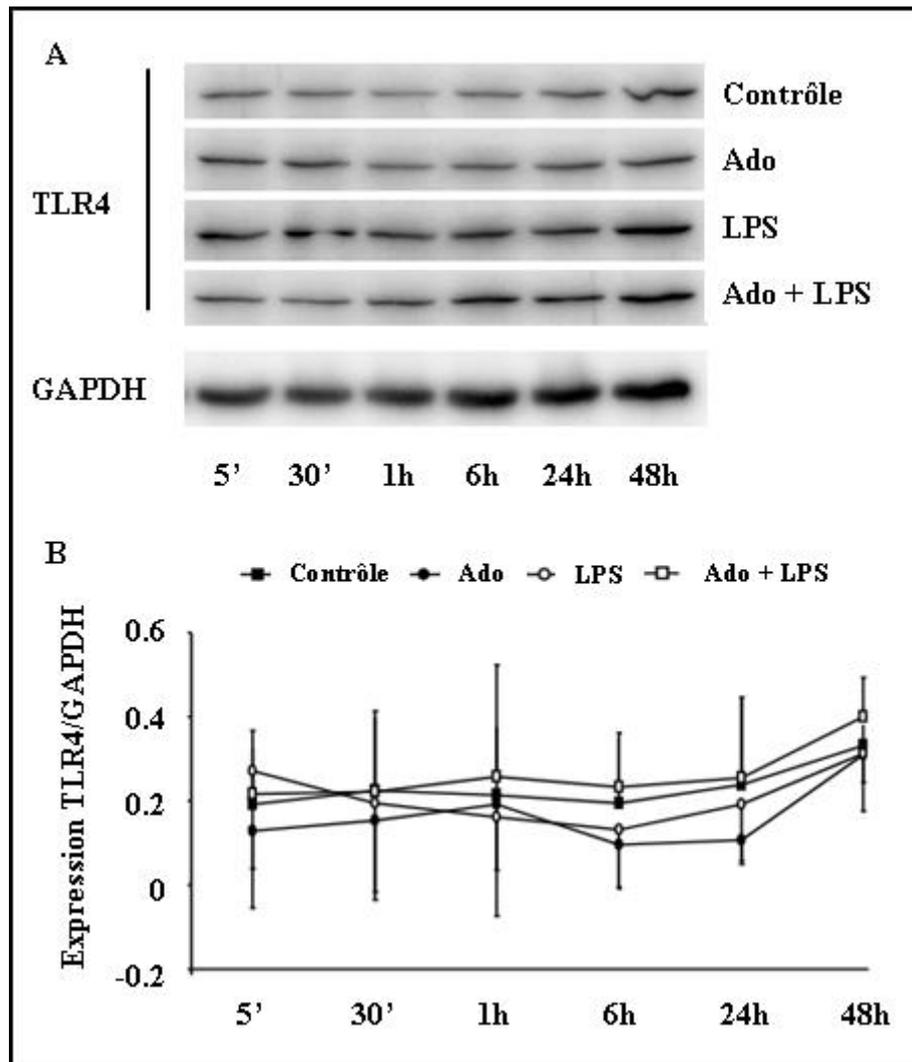
**Figure 33 :** l'adénosine augmente l'expression de l'ARNm TLR4 chez le macrophage activé issu de patients IM

*L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm TLR4 chez les macrophages activés issus de patients IM. Des monocytes primaires isolés du sang de patients IM sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. Le niveau d'expression de l'ARNm TLR4 est mesuré par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=12). # p<0.001 versus contrôle.*

Comme pour les macrophages issus de volontaires sains, l'adénosine augmente l'expression de l'ARNm TLR4. Cet effet peut s'expliquer par la mise en place d'un mécanisme de compensation de la perte d'expression de surface du TLR4 induite par l'adénosine.

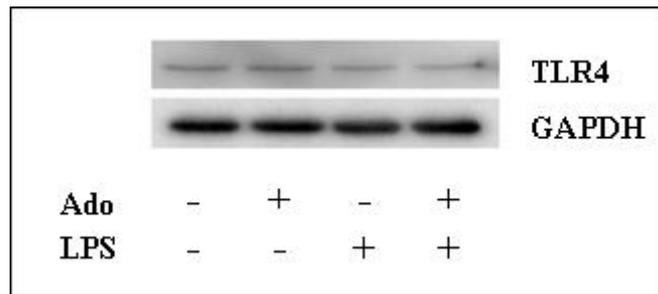
### 1.2.3°) Expression de la protéine TLR4

Nous avons utilisé des macrophages THP-1 (**Figure 34**) et primaires (**Figure 35**). Les résultats montrent que l'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 de façon significative.



**Figure 34 :** l'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage THP-1

*L'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage THP-1. Des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages par l'ajout de 150nM de PMA pendant 24 heures. Les macrophages sont ensuite pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS aux temps indiqués. L'expression de la protéine TL4 a été étudiée par Western blot et rapportée à l'expression de la GAPDH. (A) Image représentative d'une expérience parmi 3. (B) Analyse densitométrique, l'expression de TLR4 n'est pas affectée par les traitements. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3).*



**Figure 35 :** l'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage primaire

*L'adénosine ne modifie pas l'expression de la protéine TLR4 chez le macrophage primaire. Des monocytes primaires isolés du sang volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. L'expression de la protéine TLR4 a été étudiée par Western blot et rapportée à l'expression de la GAPDH. L'expression de TLR4 n'est pas modifiée par les traitements. Image représentative de 2 expériences.*

### 1.3°) Conclusion

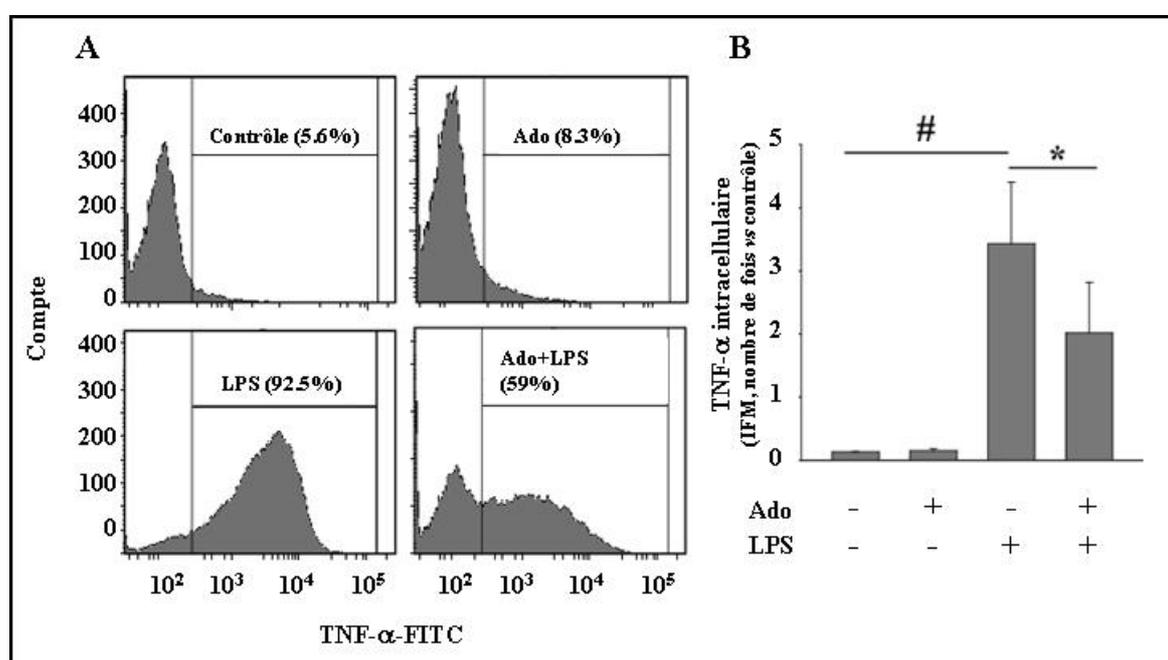
Les expériences réalisées révèlent que l'expression de surface de TLR4 est régulée négativement par le LPS après 24 heures de traitement et qu'un pré-traitement par l'adénosine est capable d'amplifier cet effet. L'adénosine agit positivement sur la synthèse d'ARNm TLR4, suggérant l'existence d'une boucle de régulation permettant de compenser la perte d'expression de surface de TLR4. Enfin, l'effet de l'adénosine ne passe pas par une modification de l'expression de la protéine TLR4.

La conséquence principale de l'activation de TLR4 est la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ . Nous avons donc étudié dans un second temps les effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages primaires activés.

## 2°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés

### 2.1°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$

Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages. Le niveau intracellulaire de TNF- $\alpha$  a été évalué par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 36**.

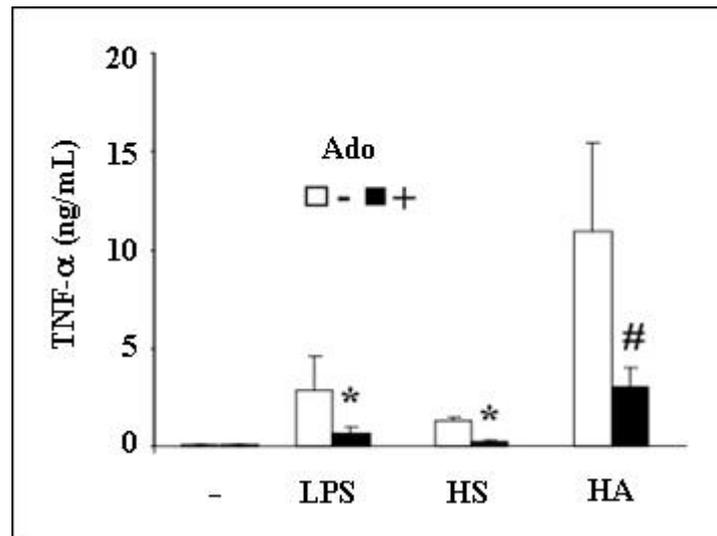


**Figure 36 :** l'adénosine réduit la synthèse de TNF- $\alpha$  au niveau intracellulaire par les macrophages activés

*L'expression intracellulaire de TNF- $\alpha$  est réduite par le pré-traitement adénosine/EHNA chez les macrophages primaires activés. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. Le niveau d'expression intracellulaire de TNF- $\alpha$  est mesuré par cytométrie en flux. (A) Histogramme représentatif d'une expérience. Les barres verticales discriminent les cellules sécrétant du TNF- $\alpha$  de celles n'en sécrétant pas. Le pourcentage de cellules*

positives pour TNF- $\alpha$  est indiqué. (B) Les résultats sont exprimés en valeurs d'intensité de fluorescence moyenne (IFM)  $\pm$  SD (n=3). #  $p < 0,001$  versus contrôle. \* $p < 0,05$  versus LPS.

Nous avons également étudié les effets de l'adénosine sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  dans le milieu extracellulaire par ELISA. Les résultats sont présentés **Figure 37**.

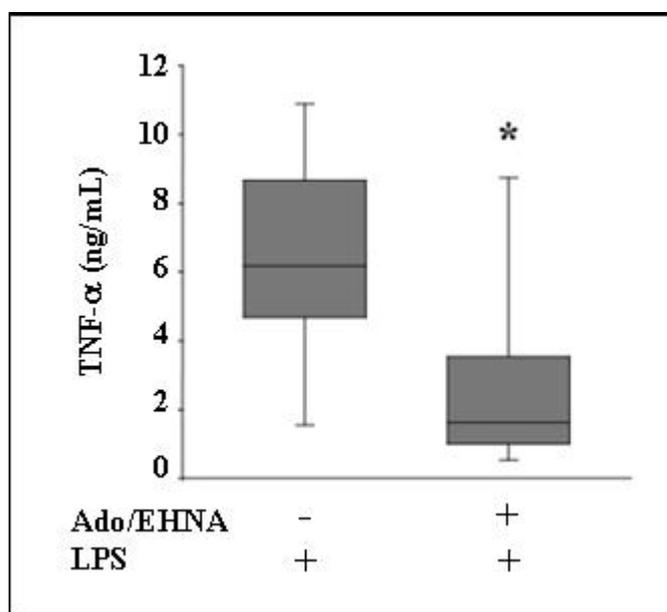


**Figure 37 :** l'adénosine réduit fortement l'accumulation de TNF- $\alpha$  induite par les ligands du TLR4 dans le milieu extracellulaire

L'adénosine réduit fortement l'accumulation de TNF- $\alpha$  induite par les ligands du TLR4 dans le milieu extracellulaire. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS ou 50 $\mu$ g/mL de HS, ou 50 $\mu$ g/mL de HA pendant 24 heures. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n $\geq$ 4). \*  $p < 0.005$  versus contrôle. #  $p < 0,05$  versus contrôle.

L'adénosine réduit la production de TNF- $\alpha$  au niveau intracellulaire et extracellulaire chez le macrophage primaire activé par le LPS (75% versus LPS) ou les ligands endogènes de TLR4.

Nous avons également observé cet effet chez les macrophages issus de patients IM activés par le LPS (**Figure 38**).



**Figure 38 :** l'adénosine réduit la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages issus de patients IM activés par le LPS

*L'adénosine réduit l'accumulation de TNF- $\alpha$  dans le milieu extracellulaire par les macrophages issus de patients IM activés. Des monocytes primaires isolés du sang de patients IM sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. L'adénosine réduit fortement l'accumulation de TNF- $\alpha$  induite par le LPS. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=12). \* p<0.001 versus contrôle.*

## 2.2°) Conclusion

Nous pouvons conclure que l'adénosine est capable d'inhiber la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages primaires issus du sang de volontaires sains et de patients IM, activés par le LPS ainsi que par des produits de dégradation de la MEC. Ces

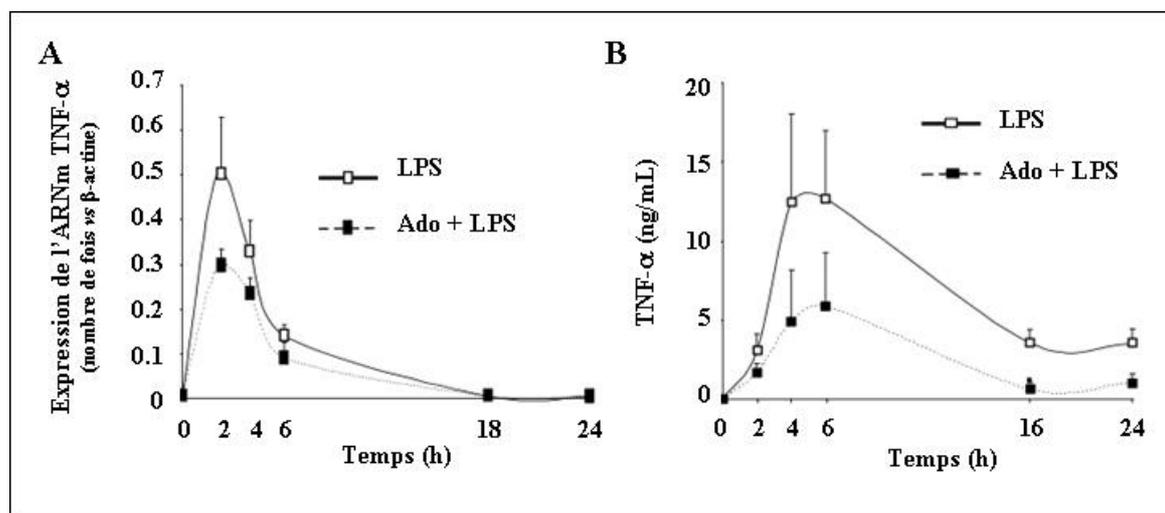
résultats étayant notre observation que l'adénosine inhibe l'inflammation en agissant sur l'expression de surface du TLR4.

### 3°) Etude mécanistique des effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés

Nous avons caractérisé les effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ , lorsqu'elle est administrée en pré-traitement 24 heures avant stimulation par le LPS.

#### 3.1°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ - cinétique

Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages. L'expression de TNF- $\alpha$  a été déterminée par PCR quantitative et ELISA (**Figure 39**).



**Figure 39 :** l'adénosine réduit la synthèse d'ARNm et de protéine TNF- $\alpha$  chez les macrophages primaires activés par le LPS

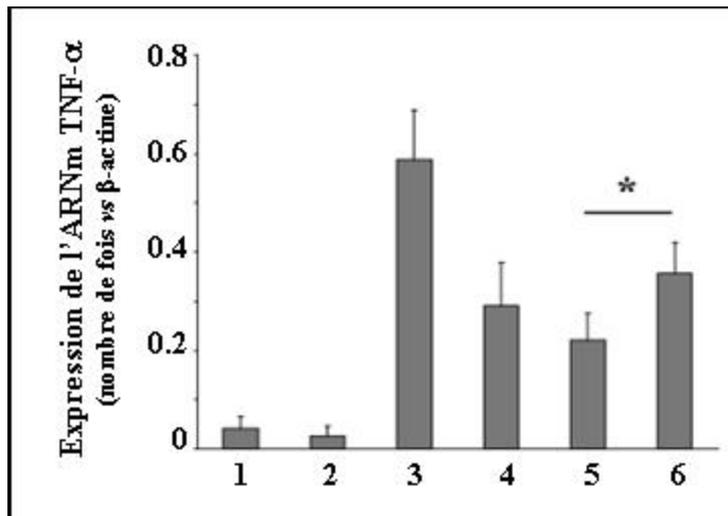
*L'adénosine réduit la synthèse d'ARNm et de protéine TNF- $\alpha$  chez les macrophages primaires activés par le LPS. (A) Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires ont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être*

*activés par 100ng/mL de LPS aux temps indiqués. L'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  a été évaluée par qPCR, les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine. L'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  est induite par le LPS et atteint sa valeur maximale après 2 heures de stimulation. L'adénosine réduit fortement cette synthèse. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3). (B) Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires ont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS aux temps indiqués. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. Le pic de synthèse de la protéine TNF- $\alpha$  apparaît après 4 heures de stimulation par le LPS et l'adénosine réduit fortement cette synthèse. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=5).*

Les résultats montrent que l'adénosine est capable de réduire l'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  chez le macrophage primaire activé, suggérant une régulation transcriptionnelle.

### **3.2°) Effets de l'adénosine sur la synthèse de TNF- $\alpha$ - séquence**

Nous avons voulu vérifier l'importance du pré-traitement par l'adénosine en l'administrant au même moment que le LPS, 20 minutes avant le traitement LPS, ou 20 minutes après (**Figure 40**).



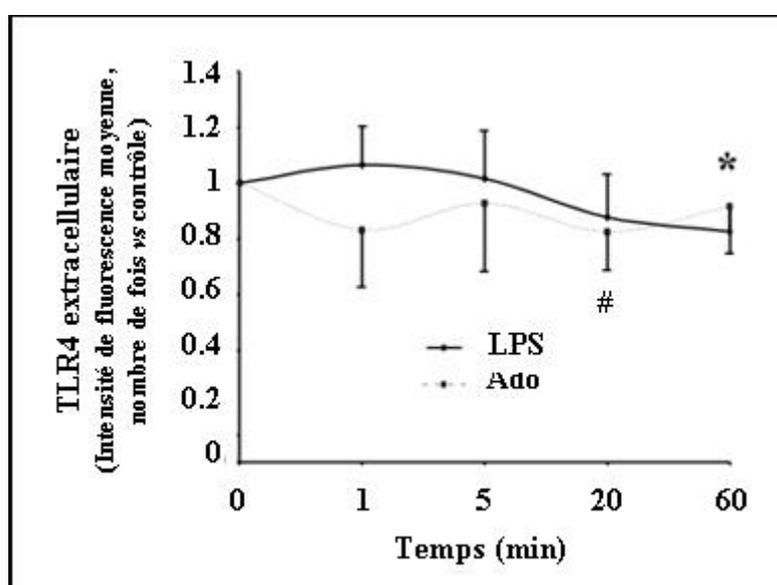
**Figure 40 :** l'inhibition de l'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  est plus importante lorsque l'adénosine est administrée en pré-traitement chez le macrophage primaire activé par le LPS

*L'adénosine diminue fortement l'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  lorsqu'elle est administrée en pré-traitement. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF. L'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$  a été évaluée par qPCR. Les cellules ont été collectées après 2 heures de traitements : (1) contrôle (2) adénosine/EHNA 10 $\mu$ M (3) LPS 100ng/mL (4) adénosine/EHNA 10 $\mu$ M + LPS 100ng/mL (5) adénosine/EHNA 10 $\mu$ M 20 minutes avant LPS 100ng/mL 6.LPS 100ng/mL 20 minutes avant adénosine/EHNA 10 $\mu$ M. L'ajout d'adénosine en pré-traitement provoque une inhibition plus forte de l'expression de l'ARNm TNF- $\alpha$ . Les résultats sont rapportés au gène de référence  $\beta$ -actine et sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=5). \* p<0.01*

Les résultats montrent que l'adénosine provoque une inhibition plus importante de l'expression du TNF- $\alpha$  induite par le LPS lorsqu'elle est ajoutée avant le LPS. Ceci indique que l'effet de l'adénosine sur le TNF- $\alpha$  passe par une inhibition de l'activation du TLR4, et non pas par un effet direct sur la synthèse de TNF- $\alpha$ .

### 3.3°) Expression de surface de TLR4

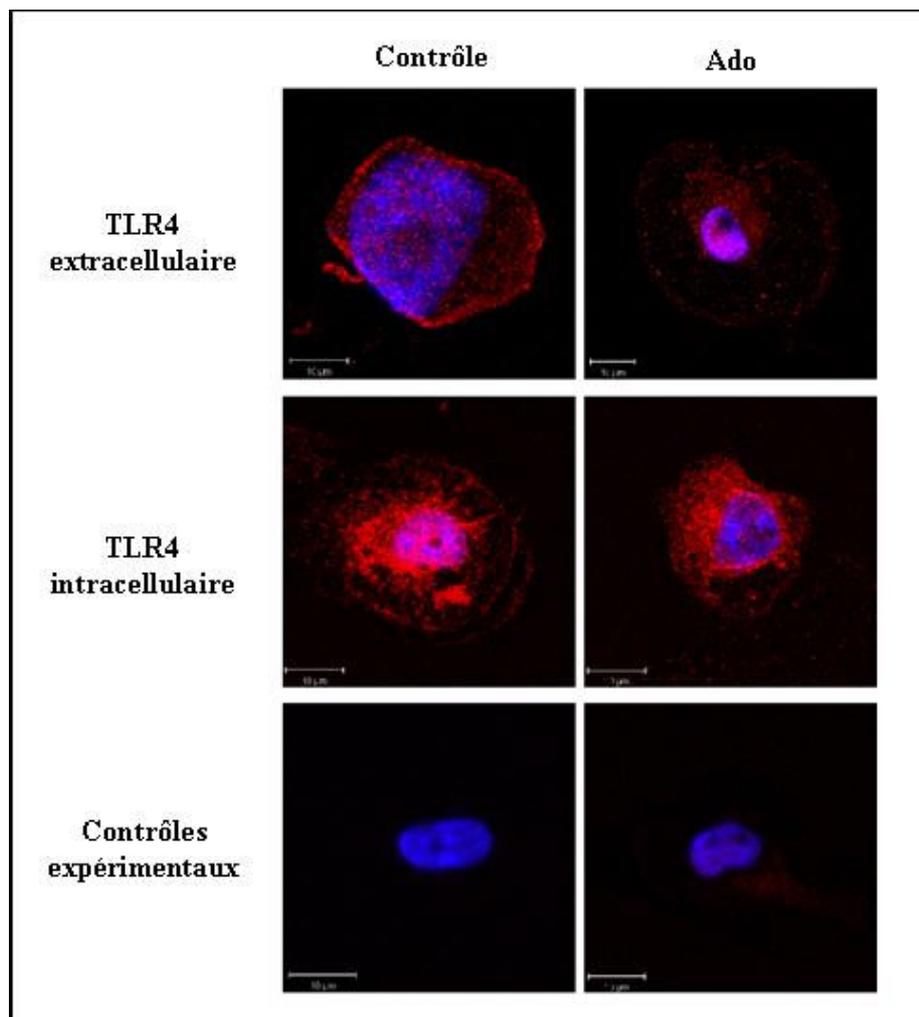
Nous avons montré que l'adénosine est capable de diminuer l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage activé à 24 heures, mais pas chez le macrophage latent. De plus, nos expériences menées sur la synthèse de TNF- $\alpha$  ont révélé une régulation très rapide par l'adénosine, ainsi que l'importance d'un pré-traitement de quelques minutes. Nous avons voulu vérifier un effet éventuel de l'adénosine seule sur l'expression de surface de TLR4 à des temps très courts. Les résultats de cette expérience sont présentés **Figure 41**.



**Figure 41 :** l'adénosine diminue l'expression de surface de TLR4 en quelques minutes chez le macrophage primaire

*L'adénosine diminue très rapidement l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage latent. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF. Les macrophages sont traités par 100ng/mL de LPS ou 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA jusqu'à 60 minutes. L'expression de surface de TLR4 a été évaluée par cytométrie en flux. L'adénosine seule diminue plus rapidement l'expression de surface de TLR4 que le traitement LPS seul. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*  $p < 0.05$  LPS 60 minutes versus contrôle. #  $p < 0.05$  adénosine 20 minutes versus contrôle.*

Les résultats indiquent que l'adénosine seule est capable de diminuer l'expression de surface de TLR4 en l'espace de quelques minutes, et de façon statistiquement significative à partir de 20 minutes. La même tendance est observée avec le LPS seul mais à 60 minutes. Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence sur des macrophages THP-1 (**Figure 42**).



**Figure 42 :** l'adénosine diminue rapidement l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1

*L'adénosine diminue rapidement l'expression de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1. Les monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages pendant 24 heures par l'ajout de 150nM de PMA, puis traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes. L'expression de surface de TLR4 a été évaluée par immunofluorescence. L'adénosine diminue très rapidement l'expression*

*de surface de TLR4 chez le macrophage THP-1 versus contrôle. L'expression de TLR4 au niveau intracellulaire n'est pas affectée par le traitement adénosine. Les contrôles expérimentaux ont été effectués sans anticorps primaire. Les images présentées sont choisies aléatoirement parmi 6 images par condition. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m.*

### **3.4°) Conclusion**

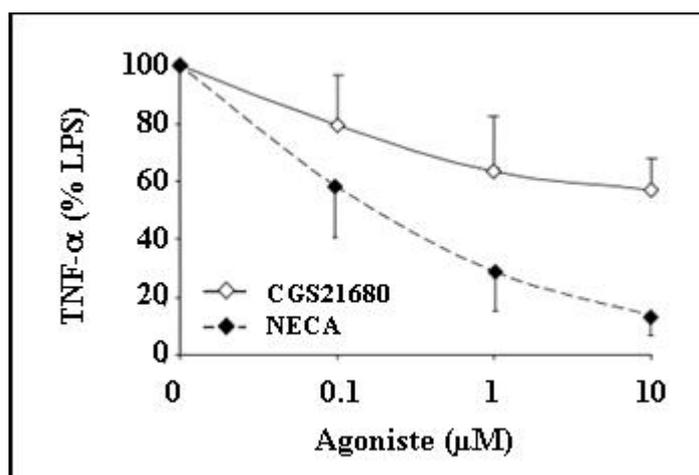
Nos résultats suggèrent que l'inhibition par l'adénosine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires passe par une diminution rapide de l'expression de surface du récepteur TLR4.

### **4°) Implication des récepteurs à l'adénosine dans la diminution de synthèse de TNF- $\alpha$ par les macrophages activés**

Nous avons voulu déterminer quel(s) type(s) de récepteur(s) à l'adénosine est (sont) impliqué(s) dans cet effet. De précédentes études menées au laboratoire indiquent que le récepteur de type A2A représente la forme prédominante à la surface des macrophages<sup>20, 254</sup>. Nous avons donc utilisé une approche pharmacologique à l'aide d'un agoniste et d'antagonistes des récepteurs de type A2 afin de déterminer leur implication dans l'inhibition de synthèse de TNF- $\alpha$  chez les macrophages primaires activés.

#### **4.1°) Effets d'agonistes des récepteurs à l'adénosine**

Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages. Les macrophages ont ensuite été soumis à des traitements par des agonistes des récepteurs à l'adénosine avant d'être activés par le LPS. L'expression de TNF- $\alpha$  a été évaluée par ELISA sur les milieux de culture conditionnés (**Figure 43**).



**Figure 43 :** l'activation spécifique du récepteur A2A inhibe la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés

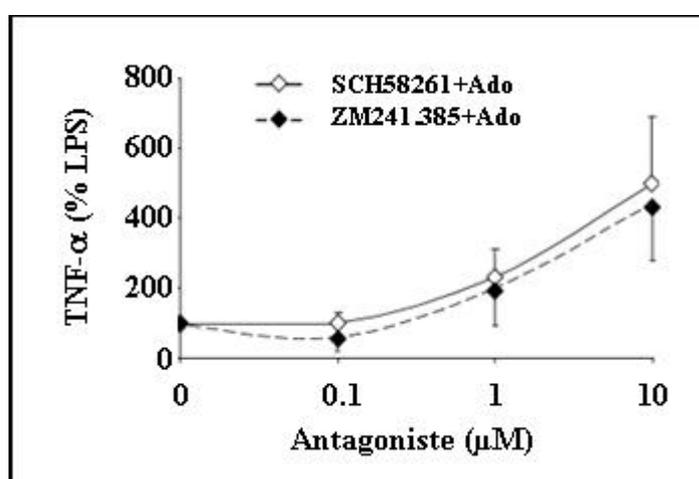
*L'activation spécifique du récepteur A2A inhibe la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 0.1 à 10 $\mu$ M de NECA (agoniste aspécifique) ou de CGS21680 (A2A spécifique) pendant 15 minutes avant d'être activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. Les agonistes des récepteurs à l'adénosine NECA et CGS21680 réduisent de façon dose-dépendante la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés par le LPS. Les résultats sont exprimés en moyenne du pourcentage de cellules traitées par le LPS  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) avec une valeur  $p < 0.05$  pour chaque traitement.*

Les résultats montrent que l'activation spécifique du récepteur A2A est capable de reproduire les effets de l'adénosine sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages primaires activés par le LPS. Cette inhibition est plus prononcée lorsque les cellules sont pré-traitées par l'agoniste non spécifique NECA. Ceci peut s'expliquer par la très haute affinité du NECA pour chacun des récepteurs à l'adénosine.

## 4.2°) Effets d'antagonistes

### 4.2.1°) Avec traitement adénosine

Nous avons utilisé des monocytes primaires issus du sang de volontaires sains et différenciés en macrophages. Les macrophages ont ensuite été soumis à des traitements par des antagonistes des récepteurs à l'adénosine avant d'être traités par l'adénosine et activés par le LPS. L'expression de TNF- $\alpha$  a été évaluée par ELISA sur les milieux de culture conditionnés (**Figure 44**).



**Figure 44 :** l'effet de l'adénosine sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés est supprimé par le blocage sélectif des récepteurs A2A/A2B

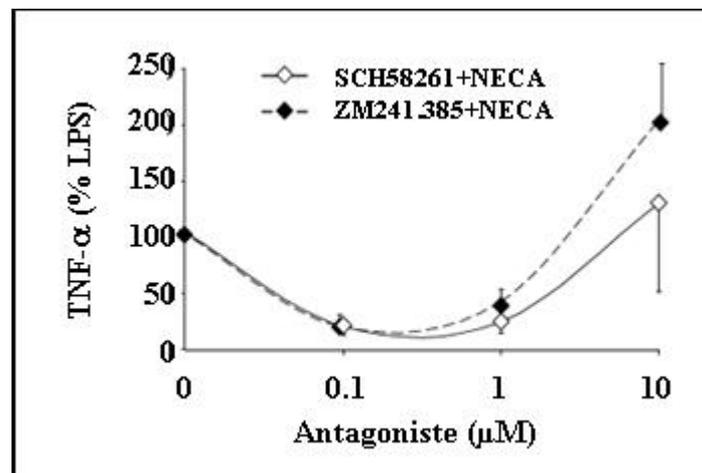
*L'effet de l'adénosine sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés est supprimé par le blocage sélectif des récepteurs A2A/A2B. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par 0.1 à 10 $\mu$ M de SCH58261 ou de ZM241.385 pendant 15 minutes avant d'être traités par 10 $\mu$ M d'adénosine/EHNA pendant 15 minutes puis activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné a été évaluée par ELISA. Les antagonistes des récepteurs à l'adénosine bloquent de façon dose-dépendante l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  induite par l'adénosine chez les macrophages activés par le LPS. Les résultats sont exprimés en moyenne du*

*pourcentage de cellules traitées par le LPS  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) avec une valeur  $p < 0.05$  pour chaque traitement.*

Ces résultats confirment l'implication du récepteur A2A dans l'inhibition de la synthèse de TNF- $\alpha$  par l'adénosine chez les macrophages activés et suggèrent également un rôle du récepteur A2B (utilisation du ZM241.385).

#### 4.2.2°) Avec traitement NECA

Nous avons ensuite stimulé les macrophages par du NECA, analogue non-spécifique des récepteurs à l'adénosine (**Figure 45**).



**Figure 45 :** l'effet du NECA sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés est supprimé par de hautes concentrations d'antagonistes des récepteurs A2A/A2B

*L'effet du NECA sur l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés est supprimé par de hautes concentrations d'antagonistes des récepteurs A2A/A2B. Des monocytes primaires isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages pendant 7 jours avec 50ng/mL de M-CSF, pré-traités par de 0.1 à 10 $\mu$ M de SCH58261 ou de ZM241.385 pendant 15 minutes avant d'être traités par 10 $\mu$ M de NECA pendant 15 minutes puis activés par 100ng/mL de LPS pendant 24 heures. La concentration de TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture conditionné*

*a été évaluée par ELISA. Seules de fortes doses d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine bloquent l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  induite par le NECA chez les macrophages activés par le LPS. Les résultats sont exprimés en moyenne du pourcentage de cellules traitées par le LPS  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) avec une valeur  $p < 0.05$  pour chaque traitement.*

Nous observons la même tendance que précédemment, cependant l'inhibition induite par le NECA n'est contrée que par de très hautes doses d'antagonistes. Ces résultats confirment l'implication des récepteurs A2A et A2B dans l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  induite par l'adénosine.

#### **4.3°) Conclusion**

Nous avons montré que les récepteurs à l'adénosine de type A2 sont capables de réduire la production de TNF- $\alpha$  chez les macrophages primaires activés. L'emploi d'un agoniste spécifique du récepteur A2A reproduit les effets de l'adénosine, tandis que l'emploi d'antagonistes des récepteurs A2A/A2B bloque ces effets.

## **Chapitre 3 : identification de l'haptoglobine comme biomarqueur potentiel de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde par analyse du protéome plasmatique**

### **1°) Recherche de biomarqueur de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde par analyse protéomique**

Établir le pronostic d'une insuffisance cardiaque chez un patient ayant subi un infarctus du myocarde constitue un enjeu médical majeur. Cependant, les outils actuels dont disposent les praticiens sont insuffisants pour confirmer efficacement ce pronostic.

L'objet de cette étude est de découvrir un ou plusieurs biomarqueur(s) de l'IC post-IM par analyse protéomique des protéines plasmatiques. Nous avons utilisé la technique de 2D-DIGE et nos résultats ont identifié la protéine haptoglobine (Hp) comme un indicateur potentiel de l'insuffisance cardiaque post-IM. Les résultats de ces travaux sont présentés et détaillés dans les sections suivantes.

### **2°) Cohorte test : données cliniques et suivi médical**

Nous avons utilisé une cohorte test de 30 patients souffrant d'un infarctus du myocarde aigu à leur arrivée aux urgences médicales. Le diagnostic est établi par la présence d'une douleur thoracique à moins de 12 heures, une élévation significative du segment ST à l'électrocardiogramme et des marqueurs cardiaques positifs (CPK et TnT). Les patients sont traités par angioplastie coronarienne. Nous avons sélectionné des patients non diabétiques, sans antécédents d'IM ni d'accident vasculaire cérébral. Le suivi médical a été réalisé après 4 mois et 1 an. Aucun décès n'a été enregistré durant ce suivi. Les données cliniques et démographiques de ce groupe de patients sont résumées dans le **Tableau 14 (Matériel et Méthodes, chapitre 2)**.

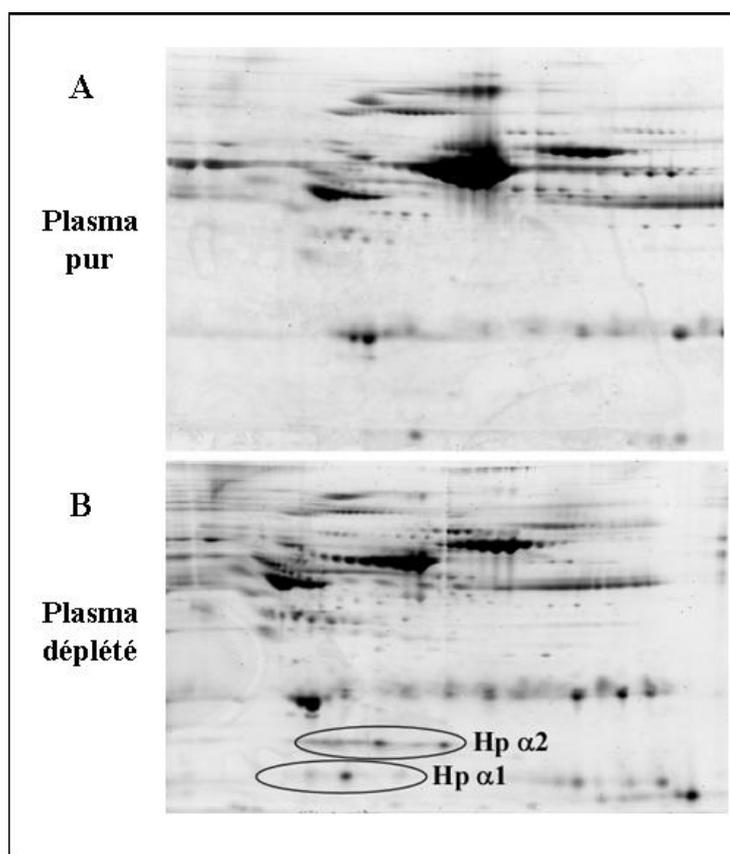
Au suivi médical à 4 mois, les patients présentent une fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) moyenne de  $51 \pm 12\%$ , comprise entre 40 et 70%. Nous n'observons aucun changement significatif après 1 an ( $51 \pm 4\%$ ). 17 patients sont de classe NYHA 1, 5 patients de classe NYHA 2 et 1 patient de classe NYHA 3.

A l'aide d'un modèle d'analyse statistique linéaire mixte, nous avons observé une corrélation entre la FEVG et le tabagisme ( $p=0.014$ ). Aucune corrélation entre la FEVG et d'autres paramètres (âge, IMC, CPK, CRP) n'a été observée.

### 3°) Identification d'un biomarqueur par analyse protéomique

#### 3.1°) Pré-traitement des plasmas

Nous avons collecté le sang des patients dans des tubes spécifiquement conçu pour prévenir la dégradation des protéines plasmatiques. Après une étape de centrifugation, le plasma est collecté et déplété de l'albumine et des immunoglobulines G. Cette étape permet ensuite d'affiner la résolution du plasma sur gel 2D (**Figure 46**). Cette amélioration a été employée par la suite pour le travail sur tous les plasmas de la cohorte test



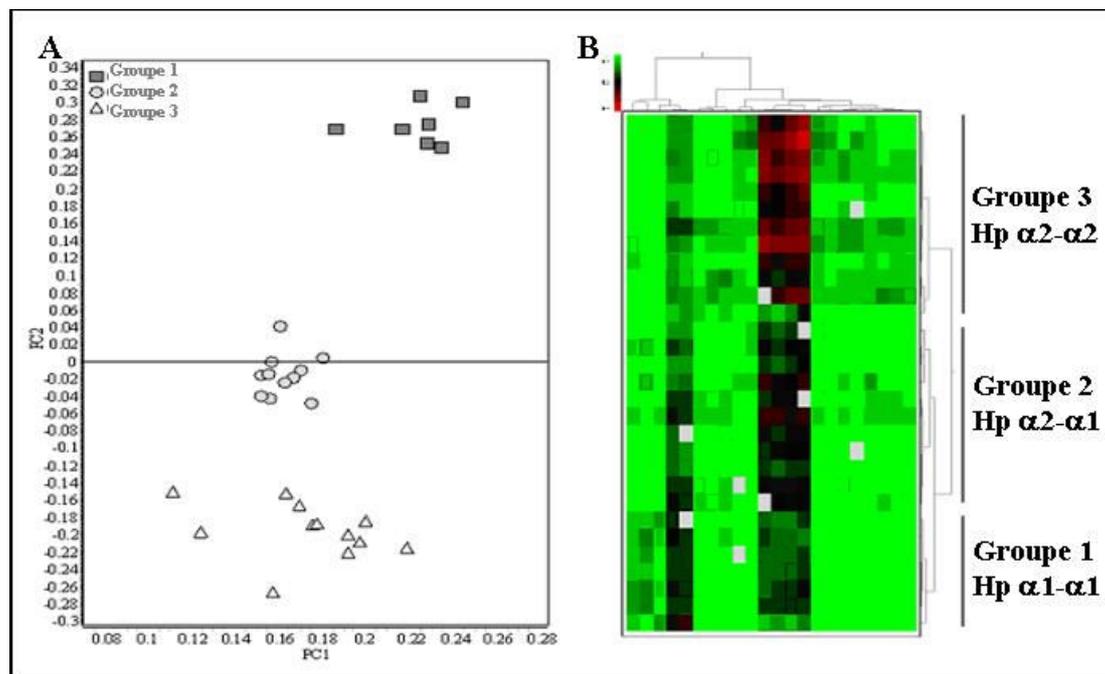
**Figure 46 :** la déplétion de l'albumine et des immunoglobulines G augmente la résolution d'un gel 2D

La déplétion de l'albumine (HSA) et des immunoglobulines G (IgG) augmente la résolution d'un gel 2D. Le plasma d'un patient infarctus a été collecté à l'aide d'un tube P100™. (A) plasma pur résolu sur gel 2D. (B) plasma déplété de HSA et IgG résolu sur gel 2D. La déplétion améliore la résolution des protéines sur gel 2D, les isoformes d'haptoglobine deviennent visibles seulement après déplétion (ellipses).

### 3.2°) Analyse protéomique par 2D-DIGE

La plate-forme de protéomique du CRP-Gabriel Lippmann a réalisé 15 gels 2D, en déposant aléatoirement 2 échantillons de patients par gel. Les gels ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel d'analyse comparative DeCyder 2D. Une approche aléatoire a été employée, en analysant les échantillons différemment exprimés à l'aide de tests statistiques multivariés sans paramètres prédéfinis (analyse en composantes principales et classification hiérarchique). Les résultats sont présentés

**Figure 47.**



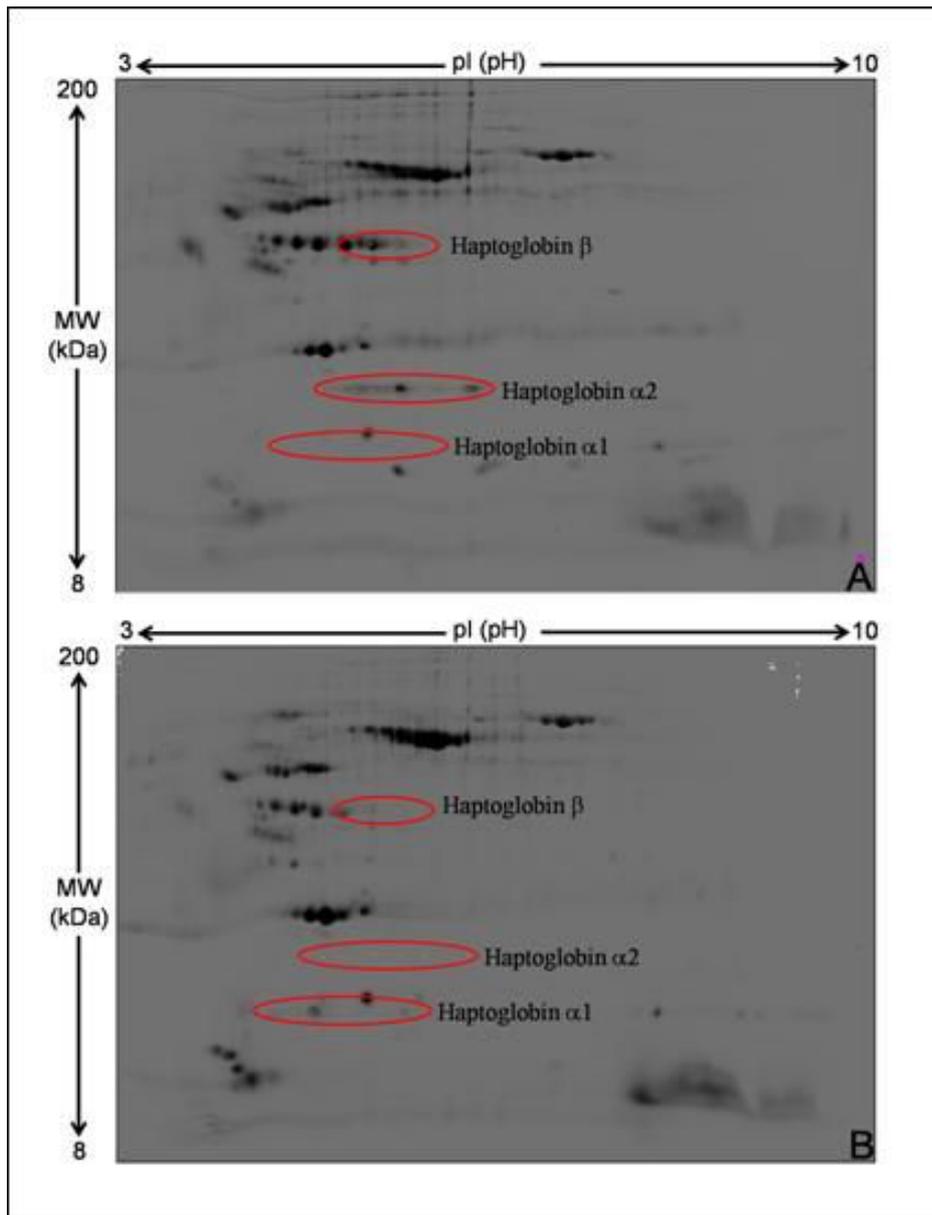
**Figure 47 :** l'analyse en composantes principales et la classification hiérarchique permettent de diviser les patients en 3 groupes

*L'analyse en composantes principales et la classification hiérarchique permettent de diviser les patients en 3 groupes. Les plasmas de 30 patients souffrant d'infarctus du myocarde ont été résolus par 2D-DIGE. L'analyse des espèces différentiellement exprimées a été réalisée grâce au logiciel Decyder 2D. L'analyse en composantes principales (A) ainsi qu'une classification hiérarchique (B) permettent de distinguer 3 groupes de patients. La variance cumulative de 90% est atteinte avec la composante 2 dans l'analyse en composantes principales.*

Les résultats obtenus indiquent que les patients sont divisés en 3 groupes. La variance cumulative de 90% est atteinte par la composante 2. Les groupes 2 et 3 sont proches l'un de l'autre, alors que le groupe 1 se détache des autres. En utilisant une technique de classification hiérarchique, le même profil se distingue, avec le groupe 1 clairement séparé des 2 autres.

Ces analyses ont révélé 22 protéines différentiellement exprimées. Ces 22 protéines ont été analysées par spectrométrie de masse et identifiées comme étant l'haptoglobine et ses isoformes respectives. La liste des 22 protéines sélectionnées est présentée en **Annexe 3**.

En raison de la forte homologie de séquence existant entre les isoformes d'haptoglobine, il est difficile de les distinguer par spectrométrie de masse. Cependant, il est tout à fait possible de les distinguer par leurs différences de poids moléculaire sur gel. Les spots sélectionnés pour l'identification ont ensuite été utilisés pour obtenir le phénotype des patients correspondants en observant les gels <sup>255</sup>. Un exemple est présenté **Figure 48**.



**Figure 48 :** gels représentatifs du phénotype haptoglobine des patients souffrant d'un infarctus du myocarde

*Gels 2D-DIGE représentatifs du phénotype haptoglobine de patients souffrant d'un infarctus du myocarde. (A) Gel représentatif d'un patient appartenant au groupe 3, présence de l'isoforme haptoglobine α-2 (B) Gel représentatif d'un patient appartenant au groupe 1, présence de l'isoforme haptoglobine α-1. kDa : kiloDalton ; MW : poids moléculaire ; pI : point isoélectrique ; ellipses oranges : zone où se trouvent les isoformes d'haptoglobine (9kDa pour α-1, 17 kDa pour α-2 et 45 kDa pour β).*

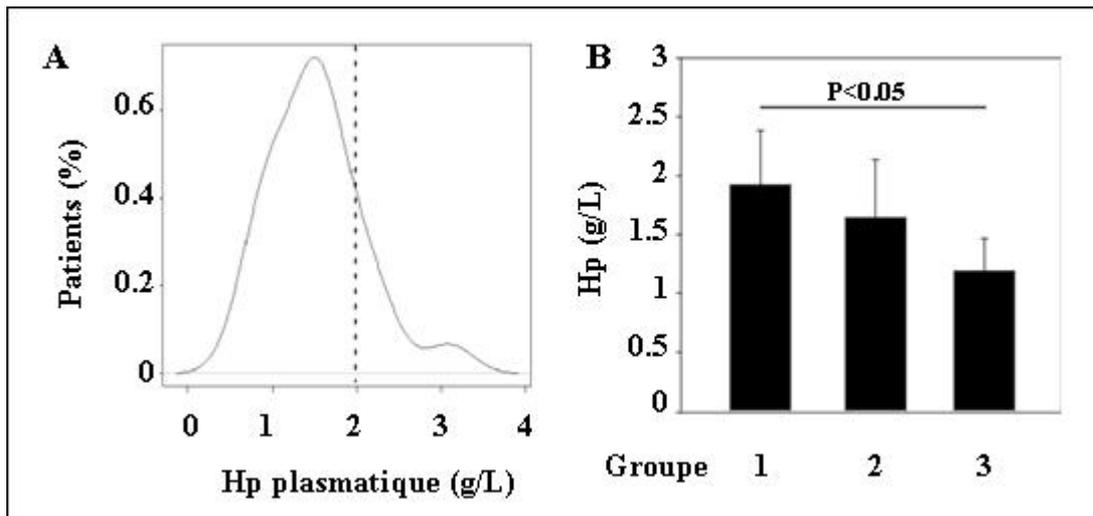
#### 4°) Corrélation avec l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde

##### 4.1°) Isoformes d'haptoglobine et taux plasmatiques

Nous avons mis en évidence que les patients inclus dans l'étude peuvent être groupés selon leur phénotype haptoglobine. Les phénotypes sont associés de la façon suivante : groupe 1 avec  $\alpha 1-\alpha 1$ , groupe 2 avec  $\alpha 2-\alpha 1$  et groupe 3 avec  $\alpha 2-\alpha 2$ .

Nous avons ensuite voulu déterminer si ce groupement peut être associé avec la sévérité de l'infarctus et les dommages myocardiques, la dysfonction ventriculaire gauche, les marqueurs de renouvellement de la MEC ou l'inflammation. Nous n'avons observé aucune corrélation statistiquement significative entre les groupes de patients et les taux de CPK, CRP et TnT, la FEVG, la MMP-9 et TIMP-1, et le taux de leucocytes.

Les mesures plasmatiques des taux d'haptoglobine indiquent que 4 patients ont des taux d'haptoglobine supérieurs à la valeur limite de 2g/L. La valeur moyenne observée est de 1.56g/L. Les patients appartenant aux 3 groupes générés par ACP et classification hiérarchique ont des taux d'haptoglobine différents selon le groupe auquel ils appartiennent (**Figure 49**). Les résultats montrent que les patients du groupe 1 ont le taux d'haptoglobine plasmatique le plus élevé, alors que le taux d'haptoglobine plasmatique des patients du groupe 3 est le plus bas.

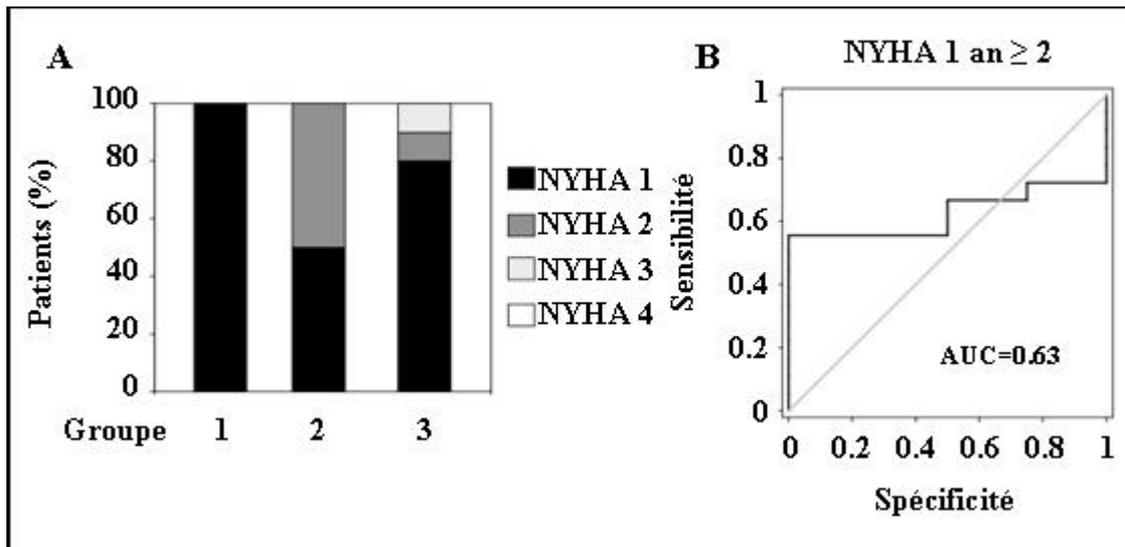


**Figure 49 :** le niveau plasmatique d’haptoglobine est lié au groupe des patients souffrant d’un infarctus du myocarde

*Le niveau plasmatique d’haptoglobine est lié au groupe des patients souffrant d’un infarctus du myocarde. Le niveau plasmatique d’haptoglobine (Hp) des 30 patients de la cohorte test a été évalué à l’aide d’un appareil de mesure biochimique automatisé. (A) courbe de fréquence. Les pointillés indiquent le seuil de 2g/L au-delà duquel les valeurs d’Hp sont anormalement hautes. (B) les 3 groupes de patients de l’étude ont des taux plasmatiques d’Hp différents. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  95% intervalle de confiance.*

#### 4.2°) Association entre l’haptoglobine et le pronostic médical

Consécutivement à un infarctus du myocarde, le pronostic est évalué par la classification fonctionnelle NYHA. Nous avons observé une corrélation entre la classe NYHA des patients et les groupements obtenus suite à l’analyse protéomique. En effet, il apparaît que tous les patients appartenant au groupe 1 sont de classe NYHA 1, 50% des patients appartenant au groupe 2 sont de classe NYHA 2 et 10% des patients du groupe 3 sont de classe NYHA 3. Aucun patient de l’étude n’appartient à la classe 4. Ces corrélations sont représentées dans la **Figure 50**.



**Figure 50 :** le phénotype haptoglobine des patients infarctus du myocarde est associé avec le score NYHA et le pronostic

*Le phénotype haptoglobine des patients infarctus du myocarde est associé avec le score NYHA et le pronostic. (A) représentation graphique de la distribution des patients dans les 3 groupes selon leur score NYHA. Tous les patients de la classe NYHA 1 appartiennent au groupe 1, 50% des patients de classe NYHA 2 appartiennent au groupe 2 et 10% des patients de classe NYHA 3 appartiennent au groupe 3. (B) Courbe de caractéristique de fonctionnement du récepteur (ROC) et aire sous la courbe (AUC) montrant que l'haptoglobine peut modestement prédire la classe NYHA au suivi médical à 1 an.*

Les résultats indiquent que l'haptoglobine peut être considérée comme un marqueur modeste de l'apparition de l'insuffisance cardiaque (score NYHA > 2). De plus, un taux plasmatique d'haptoglobine inférieur à 1.4g/L, associé avec la présence de l'isoforme  $\alpha_2$ - $\alpha_2$ , prédit l'apparition d'une insuffisance cardiaque avec une spécificité de 100%.

### 4.3°) Conclusion

Par l'intermédiaire d'une étude protéomique, nous avons mis en évidence un marqueur potentiel de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde, la protéine plasmatique haptoglobine. De plus, un taux plasmatique d'haptoglobine inférieur à 1.4g/L, associé à la présence de son isoforme  $\alpha$ -2 semble lié à un pronostic médical défavorable après un infarctus du myocarde.

# Discussion

Le remodelage du ventricule gauche post infarctus du myocarde est l'une des causes de l'apparition d'une insuffisance cardiaque lorsqu'il se dérégule. Son développement est dicté en partie par les mécanismes de l'inflammation et de reconstruction/dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque. Lors de la reperfusion de la zone infarctée, l'inflammation se met en place par l'arrivée des polynucléaires neutrophiles (première vague cellulaire inflammatoire) puis par l'arrivée des macrophages (seconde vague cellulaire inflammatoire). L'activation du récepteur de l'immunité innée Toll-like 4 (TLR4), présent à la surface des macrophages, par des constituants de la matrice extracellulaire provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires et la prolongation de l'inflammation. De plus, les neutrophiles et macrophages relarguent de grandes quantités de métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) dans le tissu cardiaque lésé. Cette enzyme est l'une des principales sources de la dégradation intensive de la matrice extracellulaire.

Les principales découvertes de ce travail de thèse sont que l'adénosine, nucléoside connu pour ses propriétés cardioprotectrices et anti-inflammatoires, diminue l'expression de surface du récepteur TLR4 chez les macrophages, réduisant ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'équipe du laboratoire a précédemment mis en évidence que l'adénosine est capable de diminuer la synthèse de MMP-9 par les polynucléaires neutrophiles, en accord avec une inhibition du remodelage matriciel dans la phase précoce de l'infarctus <sup>16</sup>. A l'inverse, nous avons montré au travers de la présente étude que l'adénosine est également capable d'augmenter la production de MMP-9 par les macrophages.

Désireux d'identifier d'autres biomarqueurs pronostiques du remodelage ventriculaire gauche post infarctus du myocarde que la MMP-9, nous avons initié une étude protéomique avec du plasma sanguin. Nous avons identifié l'haptoglobine comme biomarqueur candidat.

### **Effets de l'adénosine sur la synthèse de MMP-9 par les macrophages**

Nous avons démontré que l'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages. Cet effet implique l'activation du récepteur A3, un mécanisme transcriptionnel et une synthèse de protéine *de novo*. Ces résultats ont été observés sur des macrophages primaires, issus du sang de volontaires sains ou de patients IM, ainsi que sur des macrophages issus de la lignée pro-monocytaire THP-1.

Plusieurs études ont montré que l'activation du récepteur A3 est cardioprotective avant ou pendant une ischémie<sup>256, 257</sup>. Cette cardioprotection semble dictée par le niveau d'expression du récepteur A3 ; en effet, des souris présentant une surexpression modérée de A3 sont partiellement protégées contre des dommages ischémiques tandis que des souris présentant une forte surexpression de A3 développent des cardiomyopathies dilatées<sup>258</sup>. Ce phénomène pourrait être lié à la modulation de la production de MMP-9 par le récepteur A3 ; en effet, de petites quantités de MMP-9 peuvent favoriser l'angiogénèse<sup>259</sup> tandis que de grandes quantités de MMP-9 vont orienter le tissu cardiaque vers une dégradation matricielle et un remodelage délétère.

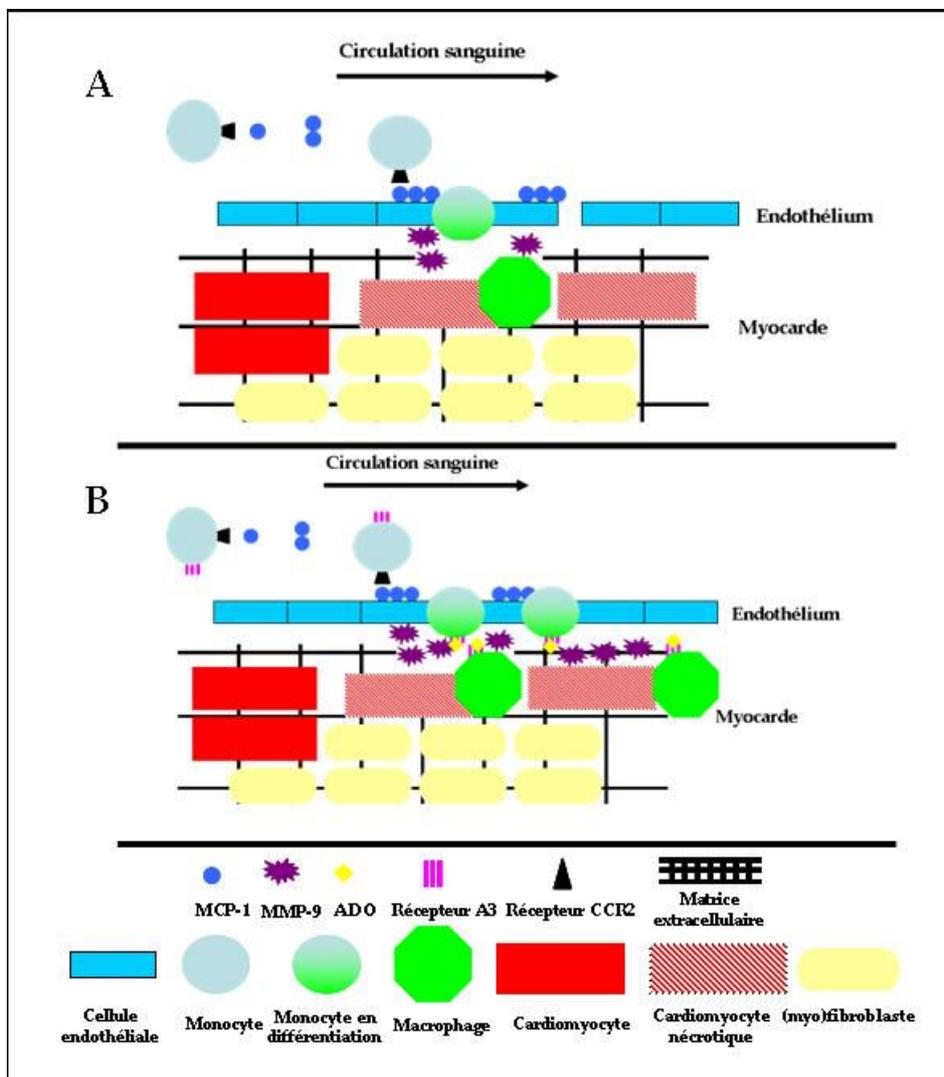
Les monocytes/macrophages représentent la seconde vague cellulaire recrutée au niveau de la zone infarctée (2 à 4 jours après l'évènement ischémique), leur mode d'action est différent et plus fin que celui des neutrophiles (première vague cellulaire recrutée immédiatement post-IM), qui relarguent massivement de la MMP-9 par dégranulation. L'équipe du laboratoire a constaté chez le neutrophile, une diminution de la production de MMP-9. Cette diminution passe par l'activation du récepteur à l'adénosine A2A<sup>16</sup>. En réalisant l'activation et l'inhibition sélectives des différents récepteurs à l'adénosine chez le macrophage, nous avons mis en évidence l'activation du récepteur A3 dans l'augmentation de la production de MMP-9. Les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les cellules inflammatoires sont donc dépendants du type de récepteur activé.

Une stratégie thérapeutique envisageable consisterait à utiliser immédiatement post-IM un agoniste A2A qui diminuerait la production de MMP-9 par les neutrophiles dans la phase précoce. Puis à utiliser un antagoniste A3 à partir du 2<sup>ème</sup> jour post-IM pour réduire la production de MMP-9 par les macrophages afin de limiter le remodelage.

### **Effets de l'adénosine sur la migration monocytaire**

La mise en place d'un remodelage du ventricule gauche s'accompagne d'une infiltration monocytaire dans le tissu cardiaque. Ce processus passe par une attraction des monocytes par la chimiokine MCP-1. Le rôle de la MCP-1 dans le remodelage myocardique est soumis à controverse depuis la découverte d'effets délétères<sup>260</sup> ou bénéfiques<sup>261</sup> sur des modèles murins. Cette controverse pourrait s'expliquer par

l'existence de 2 classes de monocytes/macrophages cardiaques, les uns exprimant le récepteur CCR2 et présents pendant la phase précoce du remodelage (monocytes/macrophages inflammatoires), les autres n'exprimant pas le récepteur CCR2 et présents lors de la phase tardive du remodelage et contribuant à la réparation du myocarde lésé<sup>262</sup>. Nos études ont mis en évidence un double effet de l'adénosine sur la migration monocyttaire et sur la réparation cardiaque. En premier lieu la migration des monocytes est favorisée par une augmentation d'expression de la MMP-9 par l'adénosine. Dans un second temps, l'adénosine favorise la guérison en réduisant l'expression de surface de CCR2 chez le macrophage. Un schéma de nos constatations et hypothèses est présenté **Figure 51**.



**Figure 51 :** modulation de la synthèse de MMP-9 par l'adénosine conditionnant la migration des monocytes dans le tissu cardiaque

*A. Les monocytes atteignent la zone lésée suivant un gradient de chimiokines MCP-1 reconnues par leurs récepteurs CCR2. Ils infiltrent le tissu cardiaque en synthétisant de la MMP-9 qui dégrade la matrice extracellulaire cardiaque. Ils se différencient en macrophages et perdent leur CCR2. B. L'adénosine, via son récepteur A3, potentialise cette infiltration en augmentant la synthèse de MMP-9 et en modulant l'expression du CCR2.*

### **Effets de l'adénosine sur le récepteur TLR4 et l'inflammation**

Lors de nos expériences visant à étudier l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9, nous avons utilisé des macrophages stimulés par du LPS ou des composants de la matrice extracellulaire, tous capables de lier et d'activer le récepteur TLR4. Le choix de composants matriciels (hyaluronan et héparane sulfate) comme activateurs de TLR4 provient du fait que le LPS n'est pas spontanément présent dans le cœur post infarctus du myocarde et que ces composants, relargués dans le myocarde post-IM, ont été décrits comme étant des activateurs de TLR4<sup>263, 264</sup>. Nos données montrent que l'adénosine potentialise la synthèse de MMP-9 chez les macrophages activés par les ligands TLR4, ce qui suggère un mécanisme de sensibilisation.

Nous avons montré que l'adénosine, en activant son récepteur A2A et dans une moindre mesure son récepteur A2B, diminue l'expression de surface du récepteur TLR4 chez les macrophages. Cet effet a été mis en évidence dans les cellules de patients souffrant d'un infarctus du myocarde et provoque une diminution de l'inflammation induite par des composants matriciels.

En comparant des volontaires sains avec des patients IM, nous avons observé une surexpression des composants du système de reconnaissance du LPS dans les cellules sanguines des patients IM, ce qui révèle une activation de la voie TLR4 après IM. Cette constatation est en accord avec des données transcriptomiques publiées en 2006<sup>265</sup>. L'activation de TLR4 chez les patients IM n'est pas liée à une augmentation du nombre des leucocytes/monocytes circulants et n'est ni corrélée au nombre total de cellules sanguines. Les patients IM ont la même distribution monocyttaire que les volontaires sains. En revanche, nos données suggèrent que l'activation de TLR4 rapidement après IM n'est pas une conséquence non spécifique de l'activation de

l'inflammation car l'expression de TLR4 est fortement corrélée avec les dommages myocardiques (indiqués par le taux de TnT). Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus sur des souris *knockout* pour TLR4 dans lesquelles la taille de l'infarctus n'est pas affectée <sup>10</sup>.

L'inflammation contribue de façon significative au remodelage du ventricule gauche. Nous avons montré que l'adénosine est capable de moduler le remodelage par son effet sur MMP-9, elle est également capable de moduler l'inflammation par son effet sur TLR4. En effet, elle affecte directement l'activation de TLR4, qui est l'un des principaux médiateurs de l'inflammation. TLR4 est massivement exprimé par les cellules du tissu cardiaque <sup>9</sup> et contribue à la réponse inflammatoire consécutive aux dommages ischémiques. L'ablation génétique de TLR4 <sup>152</sup>, ainsi que son inhibition pharmacologique <sup>153</sup> protègent les souris contre les lésions de reperfusion et réduisent la taille de l'infarctus après IM <sup>10</sup>. De plus, une inhibition de TLR4 chez la souris à l'aide d'un antagoniste spécifique, l'éritoran, a récemment montré une réduction de l'hypertrophie cardiaque due au remodelage, ainsi qu'une augmentation de la synthèse de cytokines anti-inflammatoires et une baisse des activités gélatinolytiques des MMPs, dont la MMP-9 <sup>151</sup>. Toutes ces études suggèrent que le TLR4 est délétère pour le remodelage. L'utilisation d'adénosine ou d'analogues activant spécifiquement le récepteur A2A pourraient bloquer l'activation de TLR4 et limiter le remodelage myocardique dans la phase précoce.

La fonction de TLR4 est régulée par la compartimentalisation <sup>266</sup>. Après fixation d'un ligand à TLR4, le récepteur est internalisé et dégradé dans les endolysosomes <sup>267</sup>. Ce mécanisme empêche une suractivation de la réponse inflammatoire et fait le lien entre immunité innée et adaptative. Nos données montrant une diminution de surface de TLR4 par l'adénosine sont en accord avec ce mécanisme d'internalisation. Cette hypothèse est également renforcée par le fait que l'inhibition de la synthèse de TNF- $\alpha$  est moins importante lorsque l'adénosine est ajoutée après le LPS (TLR4 toujours disponible). En revanche, l'absence d'effet direct sur la protéine totale TLR4, ainsi que l'augmentation d'ARNm TLR4 en réponse au traitement adénosine, indiquent l'existence d'un mécanisme de compensation, aboutissant à la resynthèse de TLR4, et pouvant donc limiter le bénéfice d'un traitement par

l'adénosine. Cette observation serait à prendre en compte lors de la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à limiter l'activation du TLR4 par l'adénosine.

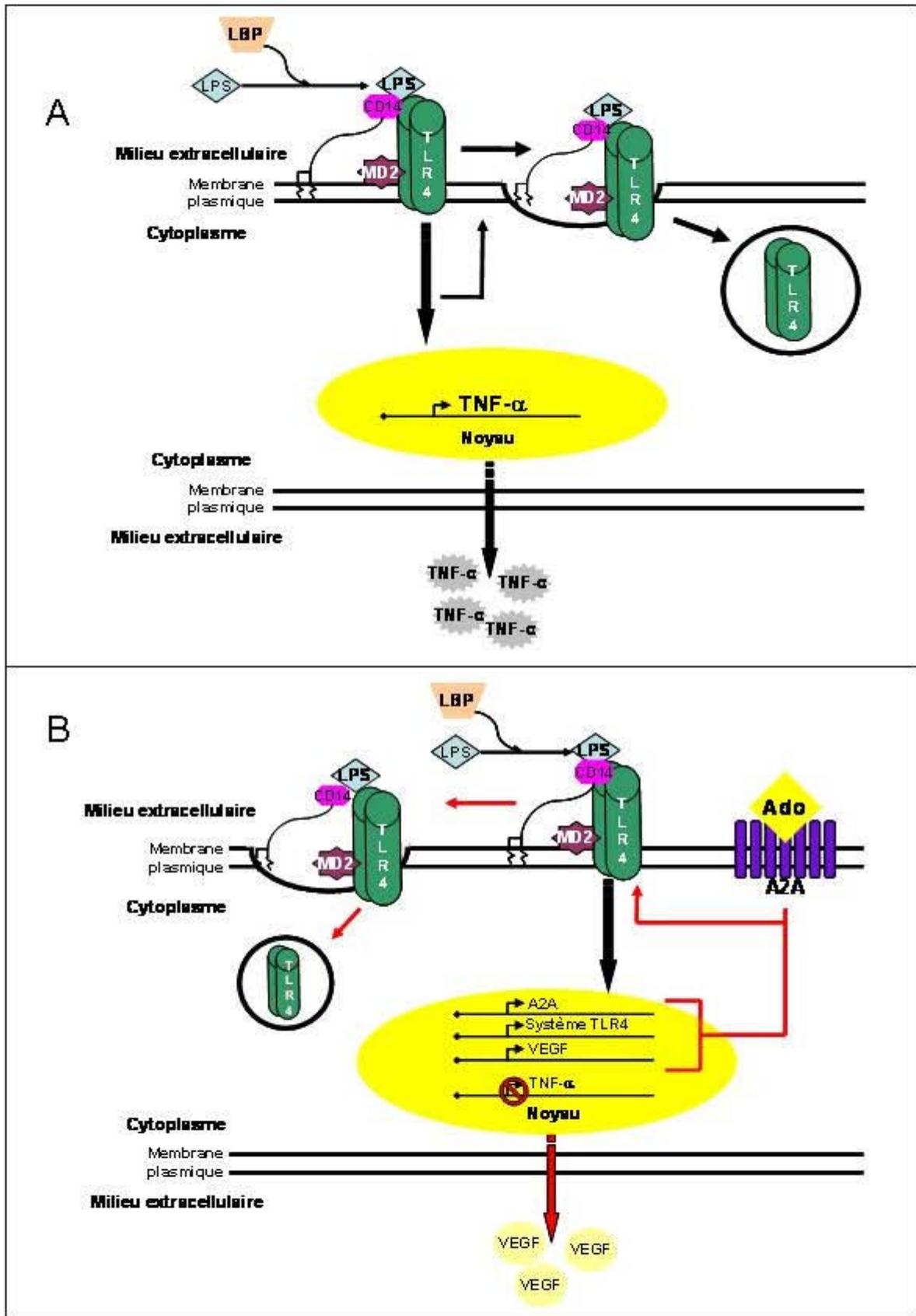
Il existe une synergie entre les récepteurs à l'adénosine et TLR4. La stimulation concomitante des récepteurs A2A et TLR4 aboutit à une augmentation de la production de VEGF et une diminution de la production de TNF- $\alpha$ . Ce mécanisme est appelé « switch angiogénique »<sup>20, 179, 180, 268</sup>. Concrètement, des macrophages stimulés par des agonistes TLR4, en présence d'adénosine ou d'agonistes du récepteur A2A, expriment fortement du VEGF et n'expriment plus de TNF- $\alpha$ , passant ainsi d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire et pro-angiogénique<sup>269</sup>. Le récepteur A2A est connu pour promouvoir l'angiogénèse et est ainsi impliqué dans le processus de guérison et de formation de la cicatrice *in vivo*<sup>270, 271</sup>. De récentes études ont indiqué que cette synergie entre TLR4 et le récepteur A2A chez le macrophage semble être dépendante de l'action de la protéine adaptatrice Myd88 liée à TLR4<sup>181, 268</sup>. Nos résultats apportent une explication supplémentaire possible pour la diminution de TNF- $\alpha$  induite par l'internalisation de TLR4, un mécanisme amplifié en présence de LPS et d'adénosine.

Nous avons identifié les récepteurs A2A et A2B comme étant impliqués dans les effets anti-inflammatoires de l'adénosine. L'activation d'A2A/A2B, mais pas d'A3, aboutit à une diminution de synthèse des cytokines pro-inflammatoires<sup>164, 177, 272, 273</sup>. De plus, des études menées au sein de notre laboratoire indiquent que le récepteur A2A est impliqué dans la diminution du remodelage précoce *via* une diminution de synthèse de MMP-9 par les neutrophiles (cardioprotection) dans la phase précoce<sup>16</sup>, ainsi que dans le switch angiogénique des macrophages<sup>20, 179</sup>. En revanche, le récepteur A3 semble impliqué dans l'augmentation de synthèse de MMP-9 par les macrophages latents ou activés, ce qui pourrait avoir un effet néfaste sur le remodelage ventriculaire.

Quelques études *in vivo* et *in vitro* indiquent tout de même un rôle du récepteur A3 dans la diminution de synthèse de cytokines pro-inflammatoires<sup>274-276</sup>. Cette apparente contradiction peut s'expliquer par les spécificités inter-espèces des effets de l'adénosine<sup>167</sup> et par le fait que la plupart des effets observés l'ont été à partir de lignées cellulaires humaines ou de modèles animaux<sup>277, 177, 273, 274, 278</sup>. Les outils pharmacologiques utilisés dans ces études, manquant parfois de spécificité,

peuvent également expliquer une partie des effets contradictoires observés. Ceci souligne la nécessité de travailler avec des modèles le plus proche possible de l'Homme, tels que des cellules primaires humaines, et de vérifier les résultats obtenus avec des agents pharmacologiques par d'autres types d'analyses plus spécifiques, comme par exemple les siARN. Nous avons montré dans cette étude, et pour la première fois chez des macrophages primaires humains, que l'adénosine est capable d'inhiber fortement la synthèse de TNF- $\alpha$  *via* une activation des récepteurs A2A et A2B.

Le LPS<sup>181, 279, 280</sup>, ainsi que les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1<sup>181, 281</sup>, sont capables d'induire l'expression du récepteur A2A chez le macrophage. La capacité du récepteur A2A à inhiber la production de TNF- $\alpha$ , alors que ce même TNF- $\alpha$  augmente l'expression du récepteur A2A, suggère l'existence d'une boucle de régulation de la réponse inflammatoire. De plus, la désensibilisation du récepteur A2A induite par l'adénosine conduit à une amplification de l'inhibition de synthèse de TNF- $\alpha$  par l'adénosine<sup>282</sup>. Nos résultats montrant que l'adénosine diminue la disponibilité du TLR4 à la surface cellulaire ajoute un niveau de complexité dans la compréhension des propriétés anti-inflammatoires de l'adénosine. Le lien entre adénosine et TNF- $\alpha$  est un mécanisme complexe impliquant plusieurs niveaux de régulation, parmi lesquels une inhibition directe par l'adénosine. Un schéma résumant les effets de l'adénosine sur la voie TLR4 est présenté **Figure 52**.



**Figure 52** : effets de l'adénosine sur le système TLR4 chez le macrophage activé

*A. Mécanisme de la réponse inflammatoire chez le macrophage activé : le LPS active la synthèse et la sécrétion de TNF- $\alpha$  et provoque l'internalisation de son récepteur TLR4 afin de limiter la réponse inflammatoire. B. Mécanisme du « switch angiogénique » induit par l'adénosine chez le macrophage activé. L'adénosine provoque l'internalisation de TLR4 très rapidement et diminue ainsi la synthèse et la sécrétion de TNF- $\alpha$ . En revanche, la synthèse et la sécrétion de VEGF est augmentée. Une boucle de régulation de la perte de TLR4 se met en place au niveau transcriptionnel, ainsi qu'une boucle de régulation du récepteur A2A. Flèches noires : activation ; flèches et traits rouges : mode d'action supposé de l'adénosine.*

### **L'haptoglobine est un biomarqueur potentiel de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde**

Un processus biologique complexe tel que le remodelage ventriculaire gauche post infarctus ne peut raisonnablement pas s'expliquer par un nombre restreint d'intervenants. Non satisfaits d'avoir caractérisé certaines des propriétés fonctionnelles et/ou pronostiques de la MMP-9 et du TLR4, nous avons mis en place une approche plus globale de cette maladie. Nous avons pour cela réalisé un profilage de l'expression des protéines plasmatiques de patients ayant développé un infarctus du myocarde. Cette étude protéomique a permis d'identifier l'haptoglobine comme biomarqueur pronostique potentiel après infarctus du myocarde.

Les avancées majeures réalisées dans le domaine de la protéomique permettent aujourd'hui d'appliquer cette technologie au domaine biomédical et plus particulièrement en recherche cardiovasculaire <sup>247</sup>. Le protéome plasmatique est considéré comme une source de biomarqueurs de la dysfonction cardiaque <sup>245, 283, 284</sup>. Des analyses protéomiques ont démontré que des protéines de haute abondance, sous forme oxydée, sont présentes dans le plasma de patients souffrant d'insuffisance cardiaque <sup>285</sup>.

L'haptoglobine est une protéine de phase aiguë exprimée par les mammifères. L'haptoglobine humaine est composée de 4 sous-unités (2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\beta$ ) liées par des ponts disulfures <sup>255</sup>. Chez l'Homme, il existe un polymorphisme fonctionnel dans le gène exprimant la sous-unité  $\alpha$ , qui code pour 2 isoformes  $\alpha$ -1 et

$\alpha$ -2<sup>286</sup>. Les 2 sous-unités  $\alpha$  ont des poids moléculaires différents, 9kDa pour  $\alpha$ -1 et 17kDa pour  $\alpha$ -2, et ont des affinités différentes pour la liaison à l'hémoglobine libre ( $\alpha$ -1 a une meilleure affinité que  $\alpha$ -2)<sup>287</sup>. Chez l'Homme, 3 génotypes sont observés :  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2- $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2- $\alpha$ 2.

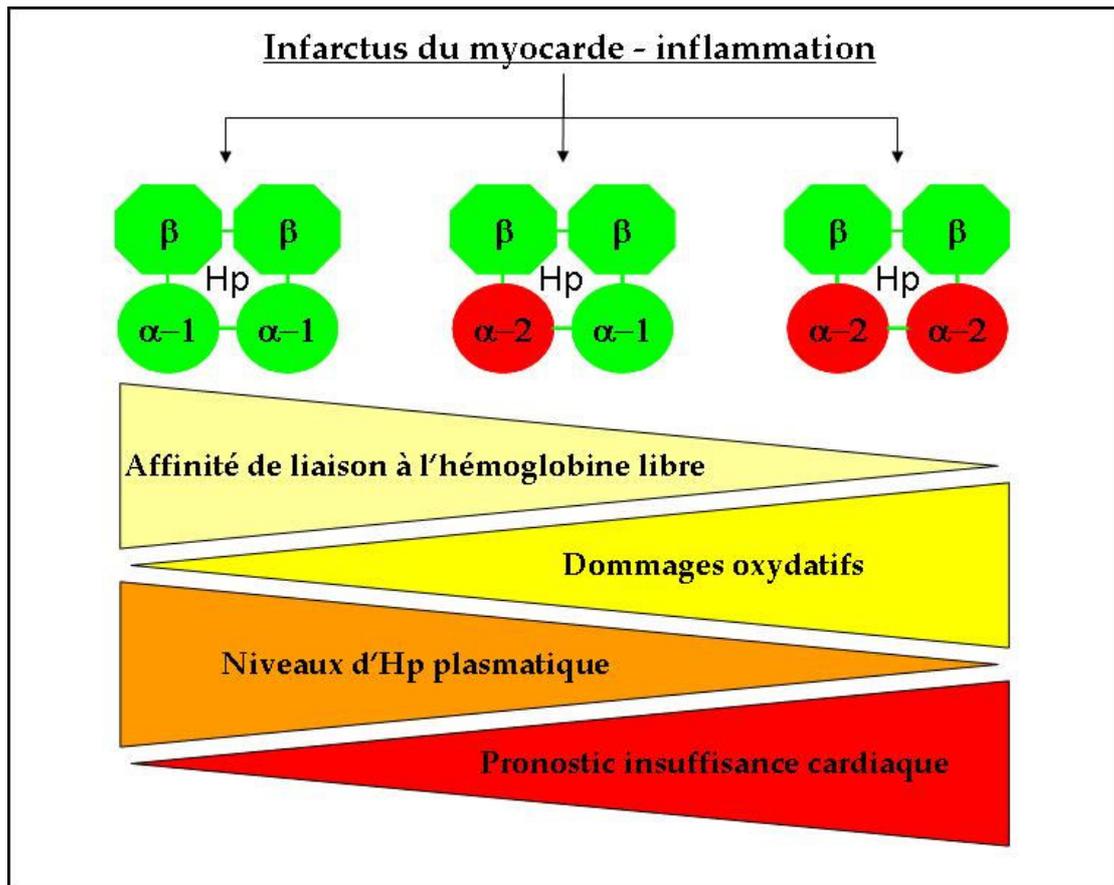
L'expression de l'haptoglobine est modulée lors d'une inflammation aiguë ou chronique<sup>287</sup>. L'haptoglobine a été mise en évidence dans des maladies impliquant une réaction inflammatoire telles que le diabète de type II<sup>288</sup>. Il semble y avoir une forte corrélation entre le phénotype d'haptoglobine et le pronostic des patients diabétiques<sup>289</sup>. Chez les patients avec un diabète de type II, le risque de développer une pathologie cardiovasculaire dépend du phénotype haptoglobine exprimé, de faible à élevé pour  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2- $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2- $\alpha$ 2<sup>290</sup>. Chez la souris diabétique, l'isoforme d'haptoglobine est associée avec le remodelage et la mortalité après infarctus du myocarde<sup>291</sup>. Ces observations sont en accord avec nos résultats suggérant une association entre le phénotype  $\alpha$ 2- $\alpha$ 2 et le pronostic après infarctus du myocarde. Notre étude révèle pour la première fois cette association chez des patients non diabétiques.

Les analyses des données de protéomique par composantes principales et classification hiérarchique ont montré que les 30 patients de la cohorte test utilisée dans notre étude peuvent être distingués selon leur phénotype d'haptoglobine. Nous n'avons observé aucune corrélation significative entre le phénotype d'haptoglobine et la sévérité de l'infarctus (évaluée par les niveaux de CPK et TnT), l'expression de marqueurs du renouvellement de la MEC (MMP-9 et TIMP-1), le niveau de marqueurs inflammatoires (numération leucocytaire et niveau de CRP), la dysfonction ventriculaire gauche (évaluée par la mesure de la FEVG), ou la mortalité post infarctus du myocarde. En revanche, nous avons mis en évidence une corrélation entre le phénotype d'haptoglobine et la classe NYHA au suivi médical à 1 an. Nos résultats suggèrent que le niveau plasmatique d'haptoglobine, en plus du type d'isoforme présent, est également un indicateur de l'apparition d'insuffisance cardiaque.

La fonction principale de l'haptoglobine est de capter l'hémoglobine libre, l'isoforme  $\alpha$ -1 possède une affinité plus haute pour l'hémoglobine que l'isoforme  $\alpha$ -2<sup>287</sup>. De cette façon, la présence du phénotype  $\alpha$ 2- $\alpha$ 2, associé à un taux plasmatique d'haptoglobine faible, pourrait aboutir à une augmentation des dommages myocardiques lors de l'infarctus du myocarde et serait associé à un

pronostic défavorable. L'haptoglobine ne semble donc pas être un acteur passif du développement de la maladie. En effet, l'hémoglobine libre est toxique lorsqu'elle ne se trouve pas dans les érythrocytes<sup>292</sup>. En raison de sa nature lipophile, l'hémoglobine peut détruire les membranes cellulaires ; de plus, la présence d'un atome de fer dans son groupement prosthétique peut conduire à la formation de ROS et à des dommages tissulaires<sup>293</sup>. La capacité de l'haptoglobine à lier l'hémoglobine libre contribue à réduire les dommages oxydatifs causés par l'hémoglobine libre<sup>294</sup>. De plus, l'haptoglobine est un modulateur de la réponse inflammatoire<sup>287</sup> et peut contribuer à la réponse inflammatoire dans le remodelage du ventricule gauche. Un autre rôle de l'haptoglobine dans le remodelage du ventricule gauche pourrait être sa capacité à se lier et interagir avec la MMP-9<sup>295</sup>.

Holme *et coll.* ont démontré que des niveaux plasmatiques élevés d'haptoglobine peuvent être utilisés pour prédire le risque de maladie cardiovasculaire<sup>296</sup>. Cette observation semble en contradiction avec nos résultats indiquant que de faibles taux d'haptoglobine plasmatiques mesurés à l'admission des patients souffrant d'un infarctus prédit le développement de l'insuffisance cardiaque (établi par la classe NYHA). Dans l'étude menée par Holme, l'haptoglobine est considérée comme un facteur de risque de développement d'une pathologie cardiovasculaire chez des volontaires sains ; sa valeur pronostique chez les patients souffrant d'un infarctus n'a pas été spécifiquement évaluée. En revanche, une étude protéomique a mis en évidence une corrélation entre la présence de certains variants post-traductionnels de l'haptoglobine  $\alpha$ -1 et le développement d'un remodelage du ventricule gauche post infarctus du myocarde<sup>297</sup>. Notre étude a mis en évidence pour la première fois que le phénotype d'haptoglobine et le taux plasmatique au moment de l'infarctus peuvent également constituer des indicateurs pronostiques de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde. Ce pronostic pourrait être réalisé de façon précoce puisque les prélèvements sanguins utilisés dans notre étude ont été effectués le jour de l'infarctus, au moment de la reperfusion. D'après nos données, nous pouvons émettre l'hypothèse que des niveaux élevés d'haptoglobine sont délétères chez le volontaire sain mais peuvent être bénéfiques chez le patient souffrant d'un infarctus. Les hypothèses émises suite à cette étude sont présentées **Figure 53**.



**Figure 53 :** la valeur pronostique de l'haptoglobine dans l'insuffisance cardiaque dépend du phénotype exprimé

*Le pronostic de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde paraît lié au phénotype haptoglobine (Hp). L'isoforme  $\alpha 2-\alpha 2$  possède une affinité pour l'hémoglobine libre plus faible que les isoformes  $\alpha 2-\alpha 1$  et  $\alpha 1-\alpha 1$ , ce qui conduirait à une augmentation des dommages oxydatifs et à la prolongation de l'inflammation chez les patients souffrant d'un infarctus du myocarde. De faibles niveaux d'Hp plasmatique, ainsi que la présence de l'isoforme  $\alpha 2-\alpha 2$ , seraient donc associés au développement de l'insuffisance cardiaque.*

Cette étude présente certaines limitations, comme la taille de la cohorte test employée. Elle doit donc être considérée comme une étude preuve-de-concept et les résultats obtenus devront être validés dans de plus grandes cohortes. L'utilisation du critère NYHA présente également une limitation à cette étude. La subjectivité de ce critère repose sur l'interprétation des symptômes du patient par le praticien ; chaque

patient à une tolérance à l'effort et une accommodation à la douleur différente. Un critère plus approprié pour évaluer la dysfonction cardiaque et l'IC pourrait être l'imagerie par résonance magnétique. Cependant cet examen n'est pas réalisé de façon systématique hors hospitalisation. Une autre limitation repose sur l'utilisation de la méthodologie employée (2D-DiGE). La 2D-DiGE représente un outil de choix pour l'étude d'un protéome, elle permet de détecter plusieurs milliers de protéines, ainsi que d'éventuelles modifications post-traductionnelles <sup>253</sup> dans un seul échantillon. Cependant, le niveau de détection est assez restreint, surtout lorsque l'on utilise un fluide biologique riche en protéines comme le plasma <sup>298</sup>. De plus, certaines protéines ne seront pas détectées en raison de problèmes de solubilisation dus à leurs points isoélectriques <sup>298</sup>. D'autres approches se sont développées pour compenser les limitations de la 2D-DiGE, notamment la « shotgun » protéomique, qui couple l'utilisation de chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse <sup>247, 299</sup>.

L'Hp est dosée en routine dans le plasma à l'aide de tests immunologiques automatisés. Cependant, on ne dispose pas toujours d'anticorps spécifiques pour valider des biomarqueurs candidats. Pour contourner ce problème, un outil protéomique a été développé, la Multiple Reaction Monitoring (MRM) <sup>300</sup>. La MRM permet de quantifier un ou plusieurs biomarqueurs dans une faible quantité de fluide biologique par spectrométrie de masse. La technique repose sur la quantification d'un ou plusieurs peptides du biomarqueur candidat comparés à une gamme de concentrations du ou des mêmes peptides synthétiques couplés à un fluorophore <sup>300</sup>. La technique a ainsi permis de quantifier l'IL-33, nouveau biomarqueur des maladies cardiovasculaires pour lequel aucun anticorps n'a été validé <sup>301</sup>. Le multiplexage est également possible avec cette technique <sup>299-301</sup>. La MRM représente donc un outil très intéressant dans le domaine des biomarqueurs. Des améliorations ont été apportées à cette technique, notamment au niveau de sa sensibilité de détection (de l'ordre de 1ng/mL) : le SISCAPA (stable isotope standards with capture anti-peptide antibodies) <sup>301</sup>. Le SISCAPA couple la MRM avec des anticorps dirigés contre les peptides biosignature. À l'heure actuelle, la SISCAPA-MRM est utilisée pour mesurer la protéine thyroglobuline (marqueur tumoral) en clinique <sup>302</sup>.

# **Conclusion et perspectives**

## **L'adénosine et le remodelage du ventricule gauche**

Une première partie de ce travail de thèse a contribué à la caractérisation de certaines propriétés cardioprotectrices de l'adénosine.

Nous avons montré que l'activation du récepteur à l'adénosine A3 augmente l'expression de la MMP-9 par les monocytes/macrophages humains, contrairement à ce qui avait été rapporté chez les polynucléaires neutrophiles. La MMP-9 contribuant au développement du remodelage ventriculaire gauche, nos résultats suggèrent de tester les effets de l'administration combinée d'activateurs du récepteur A2A et d'inhibiteurs du récepteur A3 sur le pronostic post infarctus du myocarde. Ces expériences pourraient être réalisées dans un modèle animal d'infarctus du myocarde provoqué par ligature coronaire.

Nous avons également montré que l'adénosine est capable de réduire l'expression de surface du récepteur de l'inflammation TLR4 chez le macrophage, induisant une forte inhibition de la synthèse de TNF- $\alpha$ . L'implication de cette observation dans le contexte du remodelage ventriculaire mériterait également d'être évaluée de façon approfondie dans un modèle animal d'infarctus.

## **L'haptoglobine et le pronostic après infarctus du myocarde**

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous avons identifié l'haptoglobine comme biomarqueur potentiel de la survenue de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde.

Les perspectives de cette observation seraient une validation dans une cohorte de plus grande envergure. L'utilisation de paramètres multiples d'évaluation de l'insuffisance cardiaque, obtenus par exemple par imagerie par résonance magnétique, serait souhaitable.

Ce biomarqueur potentiel de l'IC pourrait également être intégré à d'autres études dans une approche de biologie des systèmes afin de proposer une biosignature de l'IC post-IM.

# Bibliographie

1. Heidenreich, P.A. *et al.* Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* **123**, 933-944.
2. Torabi, A. *et al.* The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J* **29**, 859-870 (2008).
3. Kannel, W.B. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol* **53**, 229-235 (2000).
4. Levy, D. *et al.* Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* **347**, 1397-1402 (2002).
5. Zannad Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute hearth failure syndromes: the EFICA study. *Eur J Heart Fail* **8**, 697-705 (2006).
6. Hudson, M.P. *et al.* Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* **48**, 15-20 (2006).
7. Castro, M.M., Kandasamy, A.D., Youssef, N. & Schulz, R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*.
8. Brown, D.L. *et al.* Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 733-738 (2004).
9. Frantz, S. *et al.* Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* **104**, 271-280 (1999).
10. Timmers, L. *et al.* Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* **102**, 257-264 (2008).
11. Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M. & Coffman, R.L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* **13**, 552-559 (2007).
12. Berne, R.M. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* **204**, 317-322 (1963).
13. Jacobson, K.A. & Gao, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 247-264 (2006).
14. Ely, S.W. & Berne, R.M. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* **85**, 893-904 (1992).
15. Willems, L., Ashton, K.J. & Headrick, J.P. Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovascular research* **66**, 245-255 (2005).
16. Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y. & Wagner, D.R. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Circ Res* **99**, 590-597 (2006).
17. Wagner, D.R. *et al.* Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* **82**, 47-56 (1998).
18. Wagner, D.R., Kubota, T., Sanders, V.J., McTiernan, C.F. & Feldman, A.M. Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol* **276**, H2141-2147 (1999).
19. Wagner, D.R., McTiernan, C., Sanders, V.J. & Feldman, A.M. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart. *Circulation* **97**, 521-524 (1998).
20. Ernens, I. *et al.* Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 351-356 (2010).
21. Ezekowitz, J.A. *et al.* Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **53**, 13-20 (2009).
22. Kelly, D. *et al.* Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J* **28**, 711-718 (2007).
23. Spinale, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* **87**, 1285-1342 (2007).
24. Wagner, D.R. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *Journal of cardiac failure* **12**, 66-72 (2006).
25. Yan, A.T. *et al.* Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *Journal of cardiac failure* **12**, 514-519 (2006).
26. Wilson, E.M. *et al.* Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *Journal of cardiac failure* **8**, 390-398 (2002).

27. Altieri, P. *et al.* Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* **33**, 648-656 (2003).
28. Rohde, L.E. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **99**, 3063-3070 (1999).
29. Azuaje, F., Devaux, Y., Vausort, M., Yvorra, C. & Wagner, D.R. Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: a proof-of-concept investigation. *J Biomed Inform* **43**, 812-819.
30. Nepomuceno-Chamorro, I. *et al.* Prognostic transcriptional association networks: a new supervised approach based on regression trees. *Bioinformatics* **27**, 252-258.
31. Azuaje, F., Devaux, Y. & Wagner, D.R. Coordinated modular functionality and prognostic potential of a heart failure biomarker-driven interaction network. *BMC Syst Biol* **4**, 60.
32. Azuaje, F., Devaux, Y. & Wagner, D.R. Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction. *PLoS One* **5**, e9661.
33. Azuaje, F.J., Rodius, S., Zhang, L., Devaux, Y. & Wagner, D.R. Information encoded in a network of inflammation proteins predicts clinical outcome after myocardial infarction. *BMC Med Genomics* **4**, 59.
34. Devaux, Y., Azuaje, F., Vausort, M., Yvorra, C. & Wagner, D.R. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics* **10**, 329-337.
35. Headrick, J.P., Peart, J.N., Reichelt, M.E. & Haseler, L.J. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1413-1428.
36. Mackay, J., Mensah, G. *Atlas of Heart Disease and Stroke*. (World Health Organization, Geneva; 2004).
37. Lloyd-Jones, D.M. *et al.* Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* **106**, 3068-3072 (2002).
38. Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Donati, M.B., Iacoviello, L. & de Gaetano, G. Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. *Circulation* **121**, 1951-1959.
39. Godtfredsen, N.S. & Prescott, E. Benefits of Smoking Cessation with Focus on Cardiovascular and Respiratory Comorbidities. *Clin Respir J*.
40. Wu, A.H. *et al.* Relation of body mass index to mortality after development of heart failure due to acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* **103**, 1736-1740 (2009).
41. Pardo Silva, M.C., De Laet, C., Nusselder, W.J., Mamun, A.A. & Peeters, A. Adult obesity and number of years lived with and without cardiovascular disease. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 1264-1273 (2006).
42. Voors, A.A. & van der Horst, I.C. Diabetes: a driver for heart failure. *Heart* **97**, 774-780.
43. Andreotti, F., Porto, I., Crea, F. & Maseri, A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* **87**, 107-112 (2002).
44. Morales, A., Cowan, J., Dagua, J. & Hershberger, R.E. Family history: an essential tool for cardiovascular genetic medicine. *Congest Heart Fail* **14**, 37-45 (2008).
45. Pilote, L. *et al.* A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ* **176**, S1-44 (2007).
46. Jackson, G. Gender differences in cardiovascular disease prevention. *Menopause Int* **14**, 13-17 (2008).
47. Greenland, P. *et al.* Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA* **290**, 891-897 (2003).
48. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **451**, 914-918 (2008).
49. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 937-952 (2004).
50. Jugdutt, B.I. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* **108**, 1395-1403 (2003).
51. Hein, S., Scheffold, T. & Schaper, J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* **110**, 89-98 (1995).
52. Li, C. & Jackson, R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C227-241 (2002).
53. Frangogiannis, N.G., Smith, C.W. & Entman, M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research* **53**, 31-47 (2002).

54. Frangogiannis, N.G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* **58**, 88-111 (2008).
55. Frangogiannis, N.G. & Entman, M.L. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends in cardiovascular medicine* **15**, 163-169 (2005).
56. Diwan, A. & Dorn, G.W., 2nd Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* **22**, 56-64 (2007).
57. Vanhoutte, D., Schellings, M., Pinto, Y. & Heymans, S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovascular research* **69**, 604-613 (2006).
58. Opie, L.H., Commerford, P.J., Gersh, B.J. & Pfeffer, M.A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* **367**, 356-367 (2006).
59. Lee, K.L. *et al.* Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators. *Circulation* **91**, 1659-1668 (1995).
60. Stone, G.W. *et al.* Predictors of in-hospital and 6-month outcome after acute myocardial infarction in the reperfusion era: the Primary Angioplasty in Myocardial Infarction (PAMI) trial. *J Am Coll Cardiol* **25**, 370-377 (1995).
61. Antman, E.M. *et al.* 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation* **117**, 296-329 (2008).
62. Boersma, E., Maas, A.C., Deckers, J.W. & Simoons, M.L. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* **348**, 771-775 (1996).
63. Morrison, L.J., Verbeek, P.R., McDonald, A.C., Sawadsky, B.V. & Cook, D.J. Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis. *JAMA* **283**, 2686-2692 (2000).
64. Gruntzig, A.R., Senning, A. & Siegenthaler, W.E. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* **301**, 61-68 (1979).
65. Bourassa, M.G. Clinical trials of coronary revascularization: coronary angioplasty vs. coronary bypass grafting. *Curr Opin Cardiol* **15**, 281-286 (2000).
66. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* **29**, 2388-2442 (2008).
67. Brutsaert, D.L. & De Keulenaer, G.W. Diastolic heart failure: a myth. *Curr Opin Cardiol* **21**, 240-248 (2006).
68. Hunt, S.A. *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* **112**, e154-235 (2005).
69. Jong, P., Demers, C., McKelvie, R.S. & Liu, P.P. Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* **39**, 463-470 (2002).
70. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* **353**, 9-13 (1999).
71. Packer, M. *et al.* Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* **106**, 2194-2199 (2002).
72. Hjalmarson, A. *et al.* Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* **283**, 1295-1302 (2000).

73. Struthers, A., Krum, H. & Williams, G.H. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol* **31**, 153-158 (2008).
74. Heggveit, H.A. Morphological alterations in the ischaemic heart. *Cardiology* **56**, 284-290 (1971).
75. Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161-1172 (1990).
76. Cleutjens, J.P. & Creemers, E.E. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *Journal of cardiac failure* **8**, S344-348 (2002).
77. Cleutjens, J.P. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovascular research* **32**, 816-821 (1996).
78. Weber, K.T. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* **96**, 4065-4082 (1997).
79. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Bauersachs, J. & Ertl, G. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling. *Cardiovascular research* **54**, 559-567 (2002).
80. Sun, Y., Zhang, J.Q., Zhang, J. & Lamparter, S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* **135**, 316-323 (2000).
81. Zamilpa, R. & Lindsey, M.L. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: Causes and consequences. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 558-563 (2010).
82. Mott, J.D. & Werb, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 558-564 (2004).
83. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839 (2003).
84. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* **69**, 562-573 (2006).
85. Spinale, F.G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90**, 520-530 (2002).
86. Nagase, H. & Woessner, J.F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494 (1999).
87. Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* **378**, 151-160 (1997).
88. Nagase, H. *et al.* Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. *Adv Exp Med Biol* **389**, 23-31 (1996).
89. Nagase, H., Suzuki, K., Morodomi, T., Enghild, J.J. & Salvesen, G. Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Suppl* **1**, 237-244 (1992).
90. Nagase, H., Ogata, Y., Suzuki, K., Enghild, J.J. & Salvesen, G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans* **19**, 715-718 (1991).
91. Nagase, H., Suzuki, K., Enghild, J.J. & Salvesen, G. Stepwise activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1 (tissue collagenase) and 3 (stromelysin). *Biomed Biochim Acta* **50**, 749-754 (1991).
92. MacKenna, D., Summerour, S.R. & Villarreal, F.J. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovascular research* **46**, 257-263 (2000).
93. Browatzki, M. *et al.* Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res* **42**, 415-423 (2005).
94. Rouet-Benzineb, P., Gontero, B., Dreyfus, P. & Lafuma, C. Angiotensin II induces nuclear factor- kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 1767-1778 (2000).
95. Kawamura, N. *et al.* Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovascular research* **66**, 520-529 (2005).
96. Sivasubramanian, N. *et al.* Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* **104**, 826-831 (2001).
97. Siwik, D.A., Chang, D.L. & Colucci, W.S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* **86**, 1259-1265 (2000).
98. Bornstein, P., Armstrong, L.C., Hankenson, K.D., Kyriakides, T.R. & Yang, Z. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol* **19**, 557-568 (2000).

99. Yang, Z., Kyriakides, T.R. & Bornstein, P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell* **11**, 3353-3364 (2000).
100. Philip, S. & Kundu, G.C. Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem* **278**, 14487-14497 (2003).
101. Hall, M.C. *et al.* The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* **278**, 10304-10313 (2003).
102. Han, Y.P., Tuan, T.L., Hughes, M., Wu, H. & Garner, W.L. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* **276**, 22341-22350 (2001).
103. Galli, A. *et al.* Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* **41**, 1074-1084 (2005).
104. Thomas, C.V. *et al.* Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* **97**, 1708-1715 (1998).
105. Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C. & Heinecke, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* **276**, 41279-41287 (2001).
106. Wang, W., Sawicki, G. & Schulz, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovascular research* **53**, 165-174 (2002).
107. Peterson, J.T., Li, H., Dillon, L. & Bryant, J.W. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovascular research* **46**, 307-315 (2000).
108. Krishnamurthy, P., Peterson, J.T., Subramanian, V., Singh, M. & Singh, K. Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* **322**, 53-62 (2009).
109. Lindsey, M. *et al.* Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **103**, 2181-2187 (2001).
110. Lalu, M.M. *et al.* Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J* **26**, 27-35 (2005).
111. Ducharme, A. *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* **106**, 55-62 (2000).
112. Sun, M. *et al.* Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* **110**, 3221-3228 (2004).
113. Blankenberg, S. *et al.* Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* **107**, 1579-1585 (2003).
114. Villarreal, F.J. *et al.* Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* **108**, 1487-1492 (2003).
115. Lindsey, M.L. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H232-239 (2006).
116. Boros, P. & Bromberg, J.S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* **6**, 652-658 (2006).
117. Kaminski, K.A., Bonda, T.A., Korecki, J. & Musial, W.J. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* **86**, 41-59 (2002).
118. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. & Swirski, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437-2445.
119. Zuidema, M.Y. & Zhang, C. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol* **2**, 325-332.
120. Meldrum, D.R. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* **274**, R577-595 (1998).
121. Hill, J.H. & Ward, P.A. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med* **133**, 885-900 (1971).

122. Pinckard, R.N. *et al.* Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest* **56**, 740-750 (1975).
123. Rossen, R.D. *et al.* Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ Res* **75**, 546-555 (1994).
124. Yasojima, K., Kilgore, K.S., Washington, R.A., Lucchesi, B.R. & McGeer, P.L. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res* **82**, 1224-1230 (1998).
125. Vakeva, A.P. *et al.* Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* **97**, 2259-2267 (1998).
126. Maroko, P.R. *et al.* Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest* **61**, 661-670 (1978).
127. Griselli, M. *et al.* C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* **190**, 1733-1740 (1999).
128. Weisman, H.F. *et al.* Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* **249**, 146-151 (1990).
129. Testa, L. *et al.* Pexelizumab in ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis on 15,196 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* **136**, 884-893 (2008).
130. Barton, G.M. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 81-92 (2002).
131. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145 (2001).
132. Chao, W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H1-12 (2009).
133. Chong, A.J. *et al.* Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* **128**, 170-179 (2004).
134. Feng, Y. *et al.* Innate immune adaptor MyD88 mediates neutrophil recruitment and myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1311-H1318 (2008).
135. Shishido, T. *et al.* Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2905-2910 (2003).
136. Mann, D.L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res* **108**, 1133-1145.
137. Boyd, J.H., Mathur, S., Wang, Y., Bateman, R.M. & Walley, K.R. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovascular research* **72**, 384-393 (2006).
138. Zhu, X. *et al.* Toll-like receptor 2 activation by bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein activates cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction. *Crit Care Med* **35**, 886-892 (2007).
139. Knuefermann, P. *et al.* CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* **106**, 2608-2615 (2002).
140. Knuefermann, P. *et al.* Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* **110**, 3693-3698 (2004).
141. Xu, X.H. *et al.* Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**, 3103-3108 (2001).
142. Faure, E. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 11058-11063 (2000).
143. Vink, A. *et al.* In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* **106**, 1985-1990 (2002).
144. de Kleijn, D. & Pasterkamp, G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* **60**, 58-67 (2003).
145. Okamura, Y. *et al.* The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 10229-10233 (2001).
146. Termeer, C. *et al.* Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111 (2002).

147. Jiang, D., Liang, J. & Noble, P.W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* **91**, 221-264.
148. Haas, B. *et al.* Adenosine Reduces Cell Surface Expression of Toll-Like Receptor 4 and Inflammation in Response to Lipopolysaccharide and Matrix Products. *J Cardiovasc Transl Res*.
149. Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular research* **81**, 474-481 (2009).
150. Yang, J. *et al.* Expression of Toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells and its effects on patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Arch Med Res* **41**, 423-429.
151. Heidi Ehrentraut, C.W., Stefan Ehrentraut, Markus Schwederski, Olaf Boehm, Pascal Knuefermann, Rainer Meyer, and Georg Baumgarten **The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy**. *European Journal of Heart Failure* (2011).
152. Oyama, J. *et al.* Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* **109**, 784-789 (2004).
153. Shimamoto, A. *et al.* Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **114**, I270-274 (2006).
154. Virag, J.I. & Murry, C.E. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* **163**, 2433-2440 (2003).
155. Shryock, J.C. & Belardinelli, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* **79**, 2-10 (1997).
156. Hove-Madsen, L. *et al.* Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release. *Cardiovascular research* **72**, 292-302 (2006).
157. Okusa, M.D. A(2A) adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F10-18 (2002).
158. Dunwiddie, T.V. & Masino, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**, 31-55 (2001).
159. Spicuzza, L., Di Maria, G. & Polosa, R. Adenosine in the airways: implications and applications. *Eur J Pharmacol* **533**, 77-88 (2006).
160. Schuh, S.M., Hille, B. & Babcock, D.F. Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism. *Biol Reprod* **77**, 960-969 (2007).
161. Lloyd, H.G., Deussen, A., Wuppermann, H. & Schrader, J. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochem J* **252**, 489-494 (1988).
162. Antonioli, L. *et al.* Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 566-574 (2008).
163. Kroll, K., Decking, U.K., Dreikorn, K. & Schrader, J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res* **73**, 846-856 (1993).
164. Kumar, V. & Sharma, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* **616**, 7-15 (2009).
165. Schulte, G. & Fredholm, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **15**, 813-827 (2003).
166. Fredholm, B.B. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* **316**, 1284-1288 (2010).
167. Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J. & Muller, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. *Pharmacol Rev* (2011).
168. Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527-552 (2001).
169. Linden, J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* **67**, 1385-1387 (2005).
170. Shryock, J.C. *et al.* A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* **98**, 711-718 (1998).
171. Wang, Q.D., Pernow, J., Sjoquist, P.O. & Ryden, L. Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research* **55**, 25-37 (2002).
172. De Jonge, R., Out, M., Maas, W.J. & De Jong, J.W. Preconditioning of rat hearts by adenosine A1 or A3 receptor activation. *Eur J Pharmacol* **441**, 165-172 (2002).

173. Zhao, Z.Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H579-588 (2003).
174. Thiel, M., Caldwell, C.C. & Sitkovsky, M.V. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect* **5**, 515-526 (2003).
175. Thibault, N. *et al.* Occupancy of adenosine A2a receptors promotes fMLP-induced cyclic AMP accumulation in human neutrophils: impact on phospholipase D activity and recruitment of small GTPases to membranes. *J Leukoc Biol* **71**, 367-377 (2002).
176. Olafsson, B. *et al.* Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* **76**, 1135-1145 (1987).
177. Hasko, G. *et al.* Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* **157**, 4634-4640 (1996).
178. Feoktistov, I., Biaggioni, I. & Cronstein, B.N. Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis. *Handb Exp Pharmacol*, 383-397 (2009).
179. Leonard, F. *et al.* Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1. *J Leukoc Biol* **90**, 199-204.
180. Pinhal-Enfield, G. *et al.* An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol* **163**, 711-721 (2003).
181. Grinberg, S., Hasko, G., Wu, D. & Leibovich, S.J. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* **175**, 2439-2453 (2009).
182. Fassett, J.T. *et al.* Adenosine regulation of microtubule dynamics in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H523-532 (2009).
183. Lu, Z. *et al.* Adenosine A3 receptor deficiency exerts unanticipated protective effects on the pressure-overloaded left ventricle. *Circulation* **118**, 1713-1721 (2008).
184. Ross, A.M., Gibbons, R.J., Stone, G.W., Kloner, R.A. & Alexander, R.W. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* **45**, 1775-1780 (2005).
185. Kloner, R.A. *et al.* Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J* **27**, 2400-2405 (2006).
186. Iskandrian, A.E. *et al.* Adenosine versus regadenoson comparative evaluation in myocardial perfusion imaging: results of the ADVANCE phase 3 multicenter international trial. *J Nucl Cardiol* **14**, 645-658 (2007).
187. Buhr, C., Gossel, M., Erbel, R. & Eggebrecht, H. Regadenoson in the detection of coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 337-340 (2008).
188. Riksen, N.P. *et al.* Caffeine prevents protection in two human models of ischemic preconditioning. *J Am Coll Cardiol* **48**, 700-707 (2006).
189. Cotter, G. *et al.* The PROTECT pilot study: a randomized, placebo-controlled, dose-finding study of the adenosine A1 receptor antagonist rolofylline in patients with acute heart failure and renal impairment. *Journal of cardiac failure* **14**, 631-640 (2008).
190. Massie, B.M. *et al.* Rolofoylline, an adenosine A1-receptor antagonist, in acute heart failure. *N Engl J Med* **363**, 1419-1428.
191. Voors, A.A. *et al.* Effects of the adenosine A1 receptor antagonist rolofylline on renal function in patients with acute heart failure and renal dysfunction: results from PROTECT (Placebo-Controlled Randomized Study of the Selective Adenosine A1 Receptor Antagonist Rolofoylline for Patients Hospitalized with Acute Decompensated Heart Failure and Volume Overload to Assess Treatment Effect on Congestion and Renal Function). *J Am Coll Cardiol* **57**, 1899-1907.
192. Anderson, J.L. *et al.* ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and

- Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation* **116**, e148-304 (2007).
193. Rapezzi, C., Biagini, E. & Branzi, A. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the task force for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **29**, 277-278 (2008).
  194. Thygesen, K. *et al.* Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* **116**, 2634-2653 (2007).
  195. White, H.D. & Chew, D.P. Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**, 570-584 (2008).
  196. Wang, K., Asinger, R.W. & Marriott, H.J. ST-segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **349**, 2128-2135 (2003).
  197. Mueller, C., Neumann, F.J., Perruchoud, A.P., Zeller, T. & Buettner, H.J. Prognostic value of quantitative troponin T measurements in unstable angina/non-ST-segment elevation acute myocardial infarction treated early and predominantly with percutaneous coronary intervention. *Am J Med* **117**, 897-902 (2004).
  198. Melanson, S.F. & Tanasijevic, M.J. Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. *Cardiovasc Pathol* **14**, 156-161 (2005).
  199. Reichlin, T. *et al.* Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* **361**, 858-867 (2009).
  200. Omland, T. New sensitive cardiac troponin assays for the early diagnosis of myocardial infarction. *Drugs Today (Barc)* **47**, 303-312.
  201. Braunwald, E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* **358**, 2148-2159 (2008).
  202. Reiter, M. *et al.* Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur Heart J* **32**, 1379-1389.
  203. Anand, I.S. *et al.* C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* **112**, 1428-1434 (2005).
  204. Seta, Y., Shan, K., Bozkurt, B., Oral, H. & Mann, D.L. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *Journal of cardiac failure* **2**, 243-249 (1996).
  205. Okuyama, M. *et al.* Serum levels of soluble form of Fas molecule in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* **79**, 1698-1701 (1997).
  206. Ungvari, Z., Gupte, S.A., Recchia, F.A., Batkai, S. & Pacher, P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* **3**, 221-229 (2005).
  207. Kameda, K. *et al.* Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J* **24**, 2180-2185 (2003).
  208. Cicoira, M. *et al.* Independent and additional prognostic value of aminoterminal propeptide of type III procollagen circulating levels in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure* **10**, 403-411 (2004).
  209. Zannad, F., Rossignol, P. & Iraqi, W. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. *Heart Fail Rev* **15**, 319-329.
  210. Zannad, F., Alla, F., Dousset, B., Perez, A. & Pitt, B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* **102**, 2700-2706 (2000).
  211. Cohn, J.N. *et al.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* **311**, 819-823 (1984).
  212. McMurray, J.J., Pfeffer, M.A., Swedberg, K. & Dzau, V.J. Which inhibitor of the renin-angiotensin system should be used in chronic heart failure and acute myocardial infarction? *Circulation* **110**, 3281-3288 (2004).
  213. Swedberg, K., Eneroth, P., Kjeksus, J. & Wilhelmsen, L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* **82**, 1730-1736 (1990).
  214. Hochholzer, W., Morrow, D.A. & Giugliano, R.P. Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J* **160**, 583-594.
  215. Morgenthaler, N.G. Copeptin: a biomarker of cardiovascular and renal function. *Congest Heart Fail* **16 Suppl 1**, S37-44.

216. Khan, S.Q. *et al.* C-terminal proavopressin (copeptin) as a novel and prognostic marker in acute myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) study. *Circulation* **115**, 2103-2110 (2007).
217. La Vecchia, L. *et al.* Cardiac troponin I as diagnostic and prognostic marker in severe heart failure. *J Heart Lung Transplant* **19**, 644-652 (2000).
218. Peacock, W.F.t. *et al.* Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* **358**, 2117-2126 (2008).
219. Sugiura, T. *et al.* Circulating levels of myocardial proteins predict future deterioration of congestive heart failure. *Journal of cardiac failure* **11**, 504-509 (2005).
220. Daniels, L.B. & Maisel, A.S. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* **50**, 2357-2368 (2007).
221. Brunner-La Rocca, H.P., Kaye, D.M., Woods, R.L., Hastings, J. & Esler, M.D. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* **37**, 1221-1227 (2001).
222. Kim, H.N. & Januzzi, J.L., Jr. Natriuretic peptide testing in heart failure. *Circulation* **123**, 2015-2019.
223. Vickery, S. *et al.* B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. *Am J Kidney Dis* **46**, 610-620 (2005).
224. Tang, W.H. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation* **116**, e99-109 (2007).
225. Maisel, A.S. *et al.* Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* **347**, 161-167 (2002).
226. Januzzi, J.L., Jr. *et al.* The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* **95**, 948-954 (2005).
227. Fonarow, G.C., Peacock, W.F., Phillips, C.O., Givertz, M.M. & Lopatin, M. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1943-1950 (2007).
228. Jourdain, P. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1733-1739 (2007).
229. Walter, T. *et al.* Comparison of long-term prognostic value of N-terminal-proBNP and midregional-pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Lab* **56**, 303-309.
230. Khan, S.Q. *et al.* Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1525-1532 (2007).
231. Weinberg, E.O. *et al.* Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* **107**, 721-726 (2003).
232. Shimpo, M. *et al.* Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* **109**, 2186-2190 (2004).
233. Gerszten, R.E. & Wang, T.J. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* **451**, 949-952 (2008).
234. Lander, E.S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
235. Dorn, G.W., 2nd The genomic architecture of sporadic heart failure. *Circ Res* **108**, 1270-1283.
236. Villard, E. *et al.* A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* **32**, 1065-1076.
237. Samani, N.J. *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* **357**, 443-453 (2007).
238. Helgadottir, A. *et al.* A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* **316**, 1491-1493 (2007).
239. Weinberg, E.O. *et al.* Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* **106**, 2961-2966 (2002).
240. Heidecker, B. *et al.* Transcriptomic biomarkers for individual risk assessment in new-onset heart failure. *Circulation* **118**, 238-246 (2008).
241. Banfi, C. *et al.* Proteomic analysis of membrane microdomains derived from both failing and non-failing human hearts. *Proteomics* **6**, 1976-1988 (2006).

242. Callipo, L. *et al.* Evaluation of different two-dimensional chromatographic techniques for proteomic analysis of mouse cardiac tissue. *Biomed Chromatogr* **25**, 594-599.
243. Dubois, E. *et al.* Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin Appl* **5**, 57-66.
244. Omenn, G.S., Aebersold, R. & Paik, Y.K. 7(th) HUPO World Congress of Proteomics: launching the second phase of the HUPOPlasma Proteome Project (PPP-2) 16-20 August 2008, Amsterdam, The Netherlands. *Proteomics* **9**, 4-6 (2009).
245. Lathrop, J.T., Anderson, N.L., Anderson, N.G. & Hammond, D.J. Therapeutic potential of the plasma proteome. *Current opinion in molecular therapeutics* **5**, 250-257 (2003).
246. Isserlin, R. & Emili, A. Interpretation of large-scale quantitative shotgun proteomic profiles for biomarker discovery. *Current opinion in molecular therapeutics* **10**, 231-242 (2008).
247. Van Eyk, J.E. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circ Res* **108**, 490-498 (2011).
248. Didangelos, A. *et al.* Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*.
249. Li, W. *et al.* Proteomic analysis of metabolic, cytoskeletal, and stress response proteins in human heart failure. *J Cell Mol Med*.
250. Wishart, D.S. *et al.* HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* **35**, D521-526 (2007).
251. Kouskoumvekaki, I. & Panagiotou, G. Navigating the human metabolome for biomarker identification and design of pharmaceutical molecules. *J Biomed Biotechnol* **2011**.
252. Dettmer, K. & Hammock, B.D. Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect* **112**, A396-397 (2004).
253. McGregor, E. & Dunn, M.J. Proteomics of the heart: unraveling disease. *Circ Res* **98**, 309-321 (2006).
254. Velot, E. *et al.* Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovascular research* **80**, 246-254 (2008).
255. Tseng, C.F., Huang, H.Y., Yang, Y.T. & Mao, S.J. Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **33**, 265-273 (2004).
256. Vinten-Johansen, J. *et al.* Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg* **68**, 1942-1948 (1999).
257. Safran, N. *et al.* Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* **217**, 143-152 (2001).
258. Black, R.G., Jr. *et al.* Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A3 adenosine receptor. *Circ Res* **91**, 165-172 (2002).
259. Heymans, S. *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* **5**, 1135-1142 (1999).
260. Hayashidani, S. *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2134-2140 (2003).
261. Morimoto, H. *et al.* Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* **99**, 891-899 (2006).
262. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037-3047 (2007).
263. Tang, A.H., Brunn, G.J., Cascalho, M. & Platt, J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol* **82**, 282-285 (2007).
264. Wu, H. *et al.* TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* **117**, 2847-2859 (2007).
265. Satoh, M. *et al.* Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* **109**, 226-234 (2006).
266. Barton, G.M. & Kagan, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* **9**, 535-542 (2009).
267. Husebye, H. *et al.* Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* **25**, 683-692 (2006).
268. Macedo, L. *et al.* Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors. *Am J Pathol* **171**, 1774-1788 (2007).

269. Leibovich, S.J. *et al.* Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *Am J Pathol* **160**, 2231-2244 (2002).
270. Montesinos, M.C. *et al.* Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol* **160**, 2009-2018 (2002).
271. Montesinos, M.C., Shaw, J.P., Yee, H., Shamamian, P. & Cronstein, B.N. Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* **164**, 1887-1892 (2004).
272. Kreckler, L.M., Wan, T.C., Ge, Z.D. & Auchampach, J.A. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **317**, 172-180 (2006).
273. Kreckler, L.M., Gizewski, E., Wan, T.C. & Auchampach, J.A. Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages through a protein kinase A- and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 1051-1061 (2009).
274. Martin, L., Pingle, S.C., Hallam, D.M., Rybak, L.P. & Ramkumar, V. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 71-78 (2006).
275. McWhinney, C.D. *et al.* Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Pharmacol* **310**, 209-216 (1996).
276. Salvatore, C.A. *et al.* Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* **275**, 4429-4434 (2000).
277. Bowlin, T.L., Borchering, D.R., Edwards, C.K., 3rd & McWhinney, C.D. Adenosine A3 receptor agonists inhibit murine macrophage tumor necrosis factor-alpha production in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **43**, 345-349 (1997).
278. Hasko, G. *et al.* Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* **14**, 2065-2074 (2000).
279. Murphree, L.J., Sullivan, G.W., Marshall, M.A. & Linden, J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* **391**, 575-580 (2005).
280. Bshesh, K. *et al.* The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol* **72**, 1027-1036 (2002).
281. Khoa, N.D. *et al.* Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* **167**, 4026-4032 (2001).
282. Khoa, N.D., Postow, M., Danielsson, J. & Cronstein, B.N. Tumor necrosis factor-alpha prevents desensitization of Galphas-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Mol Pharmacol* **69**, 1311-1319 (2006).
283. Edwards, A.V., White, M.Y. & Cordwell, S.J. The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1824-1837 (2008).
284. Zhang, R. *et al.* Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* **4**, 244-256 (2004).
285. Banfi, C. *et al.* Oxidized proteins in plasma of patients with heart failure: role in endothelial damage. *Eur J Heart Fail* **10**, 244-251 (2008).
286. Smithies, O. & Walker, N.F. Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* **176**, 1265-1266 (1955).
287. Quaye, I.K. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 735-742 (2008).
288. Quaye, I.K., Ababio, G. & Amoah, A.G. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. *J Atheroscler Thromb* **13**, 90-94 (2006).
289. Costacou, T., Ferrell, R.E. & Orchard, T.J. Haptoglobin genotype: a determinant of cardiovascular complication risk in type 1 diabetes. *Diabetes* **57**, 1702-1706 (2008).
290. Levy, A.P. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol* **40 Suppl 2**, S330-333 (2003).
291. Asaf, R. *et al.* Haptoglobin genotype is a determinant of survival and cardiac remodeling after myocardial infarction in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* **8**, 29 (2009).
292. Alayash, A.I. Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nat Rev Drug Discov* **3**, 152-159 (2004).

293. Alayash, A.I. Redox biology of blood. *Antioxid Redox Signal* **6**, 941-943 (2004).
294. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198-201 (2001).
295. de Kleijn, D.P. *et al.* Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J* **16**, 1123-1125 (2002).
296. Holme, I., Aastveit, A.H., Hammar, N., Jungner, I. & Walldius, G. Haptoglobin and risk of myocardial infarction, stroke, and congestive heart failure in 342,125 men and women in the Apolipoprotein MORTality RISK study (AMORIS). *Ann Med* **41**, 522-532 (2009).
297. Pinet, F. *et al.* Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics* **8**, 1798-1808 (2008).
298. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. & Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* **73**, 2064-2077.
299. Gerszten, R.E., Asnani, A. & Carr, S.A. Status and prospects for discovery and verification of new biomarkers of cardiovascular disease by proteomics. *Circ Res* **109**, 463-474.
300. Keshishian, H. *et al.* Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2339-2349 (2009).
301. Kuhn, E. *et al.* Developing multiplexed assays for troponin I and interleukin-33 in plasma by peptide immunoaffinity enrichment and targeted mass spectrometry. *Clin Chem* **55**, 1108-1117 (2009).
302. Hoofnagle, A.N., Becker, J.O., Wener, M.H. & Heinecke, J.W. Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **54**, 1796-1804 (2008).

# **Annexes**

**Annexe 1:**

**Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages.**

Velot E, Haas B, Léonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR.

*Cardiovasc Res. 2008 Nov 1; 80(2):246-54.*

**Annexe 2:**

**Adenosine Reduces Cell Surface Expression of Toll-Like Receptor 4 and Inflammation in Response to Lipopolysaccharide and Matrix Products.**

Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR.

*J Cardiovasc Transl Res. 2011 May 3. [Epub ahead of print]*

**Annexe 3:**

**Proteomic analysis of plasma proteins identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker in acute myocardial infarction patients.**

Haas B, Serchi T, Gilson G, Planchon S, Renaut J, Wagner DR, Bohn T, Devaux Y.

*J Proteomics. 2011 Jul 15. [Epub ahead of print]*

# Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages

Emilie Velot<sup>1</sup>, Benjamin Haas<sup>1</sup>, Frédérique Léonard<sup>1</sup>, Isabelle Ernens<sup>1</sup>, Magali Rolland-Turner<sup>1</sup>, Chantal Schwartz<sup>1</sup>, Dan Longrois<sup>2,3</sup>, Yvan Devaux<sup>1</sup>, and Daniel R. Wagner<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Research, CRP-Santé, Luxembourg, Luxembourg; <sup>2</sup>Department of Anesthesia and Intensive Care, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, France; <sup>3</sup>INSERM U684, Université Henri Poincaré Nancy I, France; and <sup>4</sup>Division of Cardiology, Centre Hospitalier Luxembourg, 4 rue Barblé, L1210 Luxembourg, Luxembourg

Received 29 April 2008; revised 10 July 2008; accepted 15 July 2008; online publish-ahead-of-print 24 July 2008

Time for primary review: 29 days

## KEYWORDS

Adenosine;  
Monocytes/macrophages;  
Ventricular remodelling;  
Matrix metalloproteinase-9;  
Cell migration

**Aims** Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) plays an important role in ventricular remodelling after acute myocardial infarction (MI). The cardioprotectant adenosine (Ado) may be involved in ventricular remodelling. We have shown that Ado inhibits the secretion of MMP-9 by human neutrophils. This study investigated the effect of Ado on MMP-9 production by human macrophages.

**Methods and results** Cells used in this study were monocytes of healthy volunteers, a human monocyte cell line, and leukocytes from patients following MI. Monocytes were differentiated into macrophages and treated with Ado. Ado enhanced MMP-9 secretion by human macrophages in a time- and dose-dependent manner. Increasing the level of endogenous Ado by inhibition of Ado deaminase or Ado transferase also increased MMP-9 secretion. Ado enhanced MMP-9 production when macrophages were activated by hypoxia or Toll-like receptor-4 ligands such as lipopolysaccharide, hyaluronan, and heparan sulfate. The effect of Ado was replicated by the A3 agonist IB-MECA and inhibited by silencing the A3 receptor. Ado improved monocyte capacity to migrate through a matrix of gelatin B, and this effect was blocked by inhibition of MMP-9 activity. The chemotactic capacity of macrophages was reduced by Ado through a loss of expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor. Finally, MMP-9 expression was higher in blood cells from patients with acute MI compared with healthy volunteers.

**Conclusion** Adenosine activates MMP-9 secretion by macrophages through its A3 receptor. The effect is in contrast to that observed in neutrophils, where Ado inhibits MMP-9 secretion by the A2a receptor. These observations may have important implications for therapeutic strategies targeting Ado receptors in the setting of MI.

## 1. Introduction

Heart failure (HF) is a disease of epidemic proportion worldwide. It represents the fastest growing subclass of cardiovascular diseases over the past decade.<sup>1,2</sup> Despite significant advances in the care of HF, its morbidity and mortality remain unacceptably high: patients diagnosed with acute decompensated HF have a 1-year survival rate of 37.5%.<sup>3</sup> Post-infarct left ventricular (LV) remodelling is a leading cause of HF. Adaptive remodelling occurs in the early phase post-myocardial infarction (MI) and results in significant LV dilatation.

The transition from adaptive to maladaptive remodelling is mediated, at least partly, by dysregulated activation of the pro-inflammatory response involving both cellular and

non-cellular mediators, among which matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role. MMP-9, a member of the MMP family of zinc-endopeptidases, contributes to a large extent to maladaptive remodelling. Imbalance between MMP-9 and its inhibitory counterpart tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 results in extracellular matrix (ECM) degradation. Direct inhibition of MMP has not yet been shown to have a clinical benefit.<sup>4</sup> Cellular mechanisms involved in MMP-9 activation after MI are not thoroughly understood. Given the complex regulation of ECM biology, modulation of one of the upstream triggers of MMP-9 could be of potential therapeutic interest.

Adenosine (Ado) might be such an upstream regulator of MMP-9. Ado has been found to be cardioprotective in a range of cardiovascular disorders, particularly during myocardial ischaemia when Ado is massively released.<sup>5,6</sup> We have previously reported that Ado inhibits TNF- $\alpha$  and IL-6

\* Corresponding author. Tel: +352 44 11 2221; fax: +352 44 11 6629.  
E-mail address: wagner.daniel@chl.lu

production by cardiac myocytes<sup>7–9</sup> and MMP-9 secretion by neutrophils.<sup>10</sup> Neutrophils are among the first wave of cells recruited to infarcted tissues. The second wave of inflammatory cells recruited to the infarcted tissues consists mainly of monocytes/macrophages. These cells migrate along a gradient of the chemokine monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, which binds to its receptor CC chemokine receptor-2 (CCR2) expressed at the cell surface. Macrophages are the major contributor of MMP-9 secretion in the context of acute MI. So far, the effect of Ado on MMP-9 production by monocytes/macrophages has not been investigated.

Therefore, the present study was designed to test whether Ado could modulate MMP-9 production by monocytes/macrophages. In sharp contrast to our previous observations with neutrophils, we found that Ado consistently enhanced MMP-9 secretion by macrophages. This observation could help to explain why global activation of Ado receptors by Ado has no significant effect after MI and may direct further strategies aiming at targeting specific Ado receptors in the setting of MI.

## 2. Methods

An expanded Materials and methods section can be found in the online supplement.

The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

### 2.1 Cell culture

All cell culture reagents were from Lonza (Verviers, Belgium) unless specified otherwise. Peripheral venous blood of healthy volunteers and patients after acute MI was used in this study. Patients with acute MI were enrolled in the Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry and were treated with primary percutaneous coronary intervention. Acute MI was defined by the presence of chest pain <12 h with significant ST elevation and positive cardiac enzymes. Blood samples were obtained at the time of mechanical reperfusion. All patients signed an informed consent and the protocol has been approved by the National Ethics Committee (reference no. 200504). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll gradient. Monocytes were purified by negative selection using the Monocyte Isolation Kit II (Myltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) as described before.<sup>10</sup> Differentiation was achieved with 50 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) for 7 days. Macrophages were incubated for 15 min with 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) or vehicle, then LPS (100 ng/mL) or vehicle was added, and cells were incubated for another 24 h before harvesting.

Cells from the monocyte-like line THP-1 were treated for 15 min with EHNA vehicle (DMSO), Ado (0.01–100  $\mu$ M), Ado receptors agonists (0.1–10  $\mu$ M), EHNA (10  $\mu$ M), or dipyrindamole (DIP) (10  $\mu$ M). Cells were then differentiated into macrophages with 150 nM phorbol myristate acetate (PMA) for 24 h. Macrophages were subsequently treated with LPS (100 ng/mL), formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (10<sup>-7</sup> M), hyaluronan (HA, 10  $\mu$ g/mL), or heparan sulfate (HS, 10  $\mu$ g/mL) for another 24 h. In some conditions, cells were incubated in a Gaspak anaerobic pouch system (GasPak 100/GasPak-Pouch, Becton-Dickinson, Erembodegem, Belgium) for 24 h to simulate hypoxia. For experiments involving RNA interference, 1.4  $\mu$ g siRNA specific for each Ado receptor was transfected 48 h before Ado treatment by Nucleofection according to the manufacturer's instructions (Amaxa Inc., Cologne, Germany). The following are the selected target mRNA sequences for Ado receptors: siRNA A2a: 5'-CAGGAGTGTCTGATGATTCA-3'; siRNA A2b: 5'-CACGTATCTAGCTAATATGTA-3'; siRNA A3: 5'-CCCTATCGTCTATGCTATAA-3'.

Cells were lysed in TriReagent<sup>®</sup> prior to RNA extraction. Cell-free conditioned medium was collected and mixed with protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany) and bovine serum albumin (0.2% final concentration) to perform ELISA or zymography. All samples were stored at –80°C until analysis.

### 2.2 Real-time quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using TriReagent<sup>®</sup> and the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from blood cells collected in PAXgene<sup>®</sup> blood RNA tubes was isolated using PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit as described by the manufacturer (Qiagen). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). PCR was performed using the iCycler<sup>®</sup> and the IQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad, Nazareth, Belgium).  $\beta$ -Actin was chosen as housekeeping gene for normalization.

### 2.3 Flow cytometry

Macrophages were stained with the following antibodies: fluorescein iso thio cyanate-conjugated mouse anti-human Toll-like receptor-4 (TLR4) (clone HTA125, Abcam, Cambridge, UK), APC-Cy7-conjugated mouse anti-human CD14 (clone M  $\phi$ P9, BD Biosciences), AlexaFluor647-conjugated mouse anti-human CCR2 (clone 48607, BD Biosciences), and appropriate isotype controls. Ten thousand events were analysed on a BD FACSCanto<sup>™</sup> flow cytometer (BD Biosciences), and analysis was performed with the FACSDiva<sup>™</sup> software (BD Biosciences).

### 2.4 Analysis of gelatinase activity

Gelatin zymography was performed on culture supernatants to assess secreted MMP-9 activity as described before.<sup>10</sup>

### 2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay

Total MMP-9 and TIMP-1 concentrations in conditioned medium were measured by ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK). Detection limits were 0.156 ng/mL for MMP-9 and 0.08 ng/mL for TIMP-1.

### 2.6 Migration assay

Migratory capacity of THP-1 monocytes was studied using a Transwell<sup>®</sup> system with polycarbonate microporous membranes coated with 15  $\mu$ L of a 2% gelatin B solution. MCP-1 (10 ng/mL) was added in the bottom compartment. Cells were pre-incubated for 30 min with GM 6001 (10 nM or 1  $\mu$ M) or TIMP-1 (10 ng/mL) before seeding into the upper compartment. After 24 h, cells that migrated through the membrane were stained by the CyQuant GR<sup>®</sup> dye (Invitrogen) and fluorescence was read.

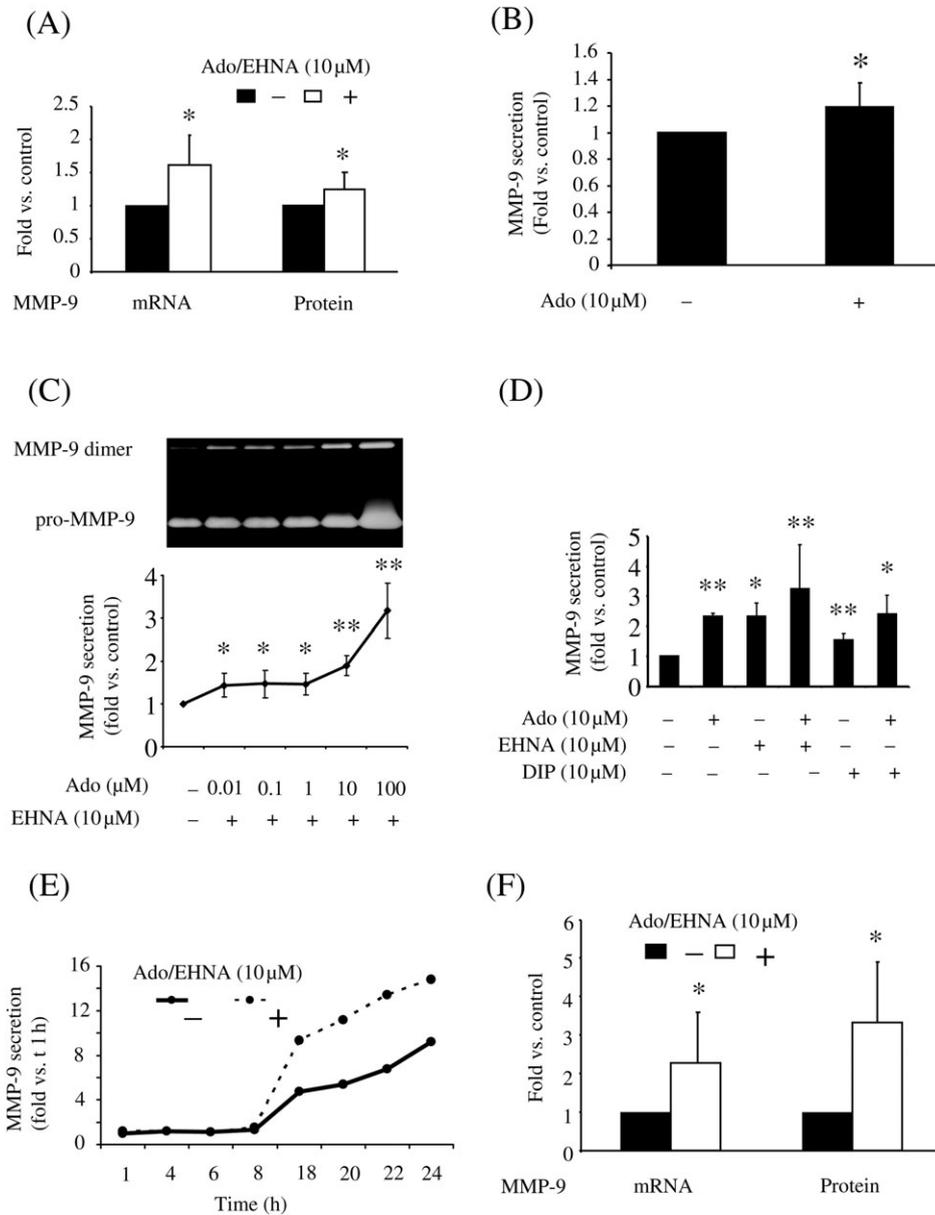
### 2.7 Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Data with a Gaussian distribution were analysed by paired *t*-test. Mann-Whitney (unpaired data) or Wilcoxon (paired data) tests were used for non-Gaussian data. A *P*-value <0.05 was considered significant.

## 3. Results

### 3.1 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 production by primary macrophages from healthy volunteers and myocardial infarction patients

Monocytes were isolated from PBMCs obtained from both healthy volunteers and MI patients by negative selection and differentiated along the macrophage lineage by M-CSF.



**Figure 1** Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production by primary and THP-1-derived macrophages. Monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers and myocardial infarction patients by negative selection were differentiated with 50 ng/mL M-CSF for 7 days. Macrophages were incubated for 24 h with Ado and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) (10 μmol/L each) or vehicle. THP-1 cells were treated for 15 min with Ado and 10 μM EHNA or vehicle before differentiation into macrophages with 150 nM PMA for 48 h. EHNA, which inhibits Ado deaminase, and dipyrindamole (DIP), which inhibits Ado transport, were used to enhance endogenous Ado concentration. MMP-9 mRNA levels were assessed by quantitative PCR and protein levels in cell supernatants by ELISA. Gelatinase activity was measured in cell-free conditioned medium by zymography and densitometry. (A) Ado increased MMP-9 mRNA and protein expression by primary human macrophages from healthy volunteers. Results are mean ± SD (n = 8). \*P < 0.05 vs. control. (B) As assessed by zymography in conditioned medium, MMP-9 production by macrophages from MI patients was increased by Ado. Results are mean ± SD (n = 4). \*P < 0.05 vs. control. (C-F) These were generated from experiments with THP-1-derived macrophages. (C) A representative zymogram is shown. Densitometric analysis revealed that Ado dose-dependently increased MMP-9 secretion. Results are mean ± SD (n = 8). \*P < 0.05 vs. control, \*\*P < 0.01 vs. control. (D) Zymography showed that both endogenous and exogenous Ado enhanced MMP-9 secretion. Alone, Ado, EHNA, and DIP triggered MMP-9 secretion and their effects were additive. Results are mean ± SD (n = 4). \*P < 0.05 vs. control, \*\*P < 0.01 vs. control. (E) Time-course experiment (n = 1). Measuring MMP-9 release in culture medium by zymography revealed that a differentiation period of 18 h was necessary to trigger MMP-9 secretion and that Ado was only effective after 18 h. (F) Quantitative PCR and ELISA showed that Ado increased MMP-9 mRNA and protein expression after 48 h of differentiation. Results are mean ± SD (n = 6). \*P < 0.05 vs. control.

The effects of Ado on MMP-9 production were measured by quantitative PCR and ELISA. Using both techniques, a mild but significant increase in MMP-9 secretion was detected in the Ado-treated group. Ado induced a 70% increase in

MMP-9 mRNA expression and a 20% increase in MMP-9 protein secretion in cell supernatants obtained from both cultures of macrophages from healthy volunteers and MI patients (Figure 1A and B).

### 3.2 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 production by THP-1-derived macrophages

Having demonstrated that Ado consistently increases MMP-9 secretion by primary macrophages, we explored the mechanisms responsible for this effect in macrophages differentiated from the monocytic cell line THP-1. Cells were incubated for 15 min with increasing concentrations of Ado and 10  $\mu$ M EHNA prior to differentiation with 150 nM PMA for 48 h. Ado increased MMP-9 production by THP-1 macrophages in a dose-dependent manner, reaching a three-fold increase with 100  $\mu$ M Ado (Figure 1C). Ado also increased MMP-9 production when it was added after differentiation (data not shown). Concentrations of 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M EHNA were used in further experiments. Considering that Ado concentrations found *in vivo* in conditions like HF<sup>11</sup> and sepsis<sup>12</sup> are in the micromolar range, our results suggest that the effect reported here is of biological relevance.

### 3.3 Both endogenous and exogenous Ado enhance matrix metalloproteinase-9 secretion

To characterize the relative contribution of endogenous and exogenous Ado in MMP-9 production, several modulators of Ado metabolism such as EHNA, which enhances endogenous Ado through inhibition of Ado deaminase, and DIP, which inhibits Ado transport, were used. When added alone, Ado, EHNA, or DIP induced MMP-9 secretion. When Ado was combined with EHNA or DIP, an additive effect was observed, resulting in a higher MMP-9 secretion than each substance alone (Figure 1D). These data show that both endogenous and exogenous Ado stimulate MMP-9 secretion.

### 3.4 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein expression

To investigate the mechanism involved in enhanced MMP-9 secretion, we performed time-course experiments. An incubation period of at least 18 h was necessary to detect the effect of Ado on MMP-9 (Figure 1E). Using quantitative PCR, we observed that Ado induced a more than two-fold increase in MMP-9 mRNA expression in THP-1 cells, which was higher than in primary macrophages (Figure 1F). In parallel, we determined a three-fold increase in MMP-9 protein expression by ELISA (Figure 1F). Together, these observations suggest that the Ado-dependent release of MMP-9 is regulated at the transcriptional level.

### 3.5 Adenosine increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not RECK expression

Imbalance between MMPs and TIMPs can result in the deregulation of ECM turnover and lead to the development of adverse remodelling. Ado mildly increased TIMP-1 secretion, the main endogenous inhibitor of MMP-9 (see Supplementary material online, Figure S1). This suggests the existence of a feedback loop to compensate for the increased MMP-9 production. However, considering the equimolar ratio of the MMP-9/TIMP-1 heterodimer, the low increase in TIMP-1 (40%) is probably insufficient to counterbalance the three-fold increase in MMP-9 secretion (see Supplementary material online, Figure S1).

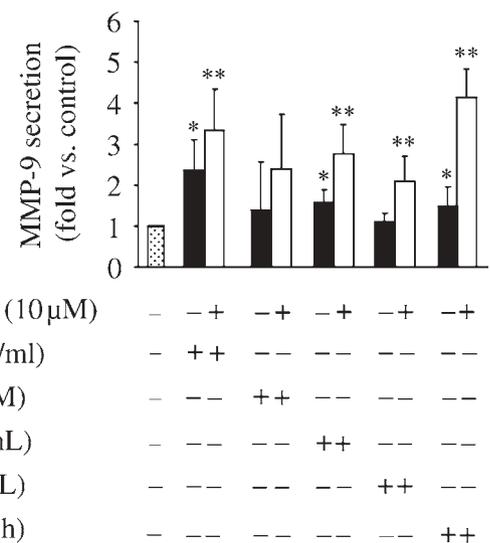
The membrane-anchored inhibitor of MMP, RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs), a key regulator of ECM turnover,<sup>13</sup> inhibits pro-MMP-9 processing to the active MMP-9 form. As shown in the Supplementary material online, Figure S1, Ado did not modify RECK expression.

### 3.6 Adenosine increased matrix metalloproteinase-9 production by activated macrophages

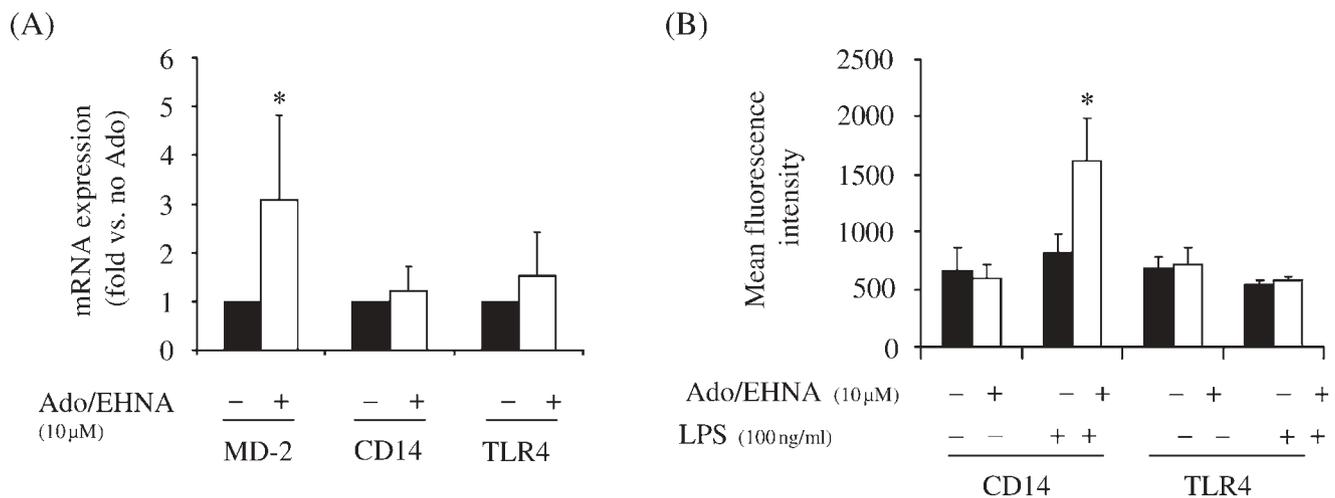
We next determined whether Ado could also increase MMP-9 production by macrophages activated by stimuli such as the bacterial superantigen LPS or the peptide fMLP. In addition, several potential activators of the TLR4 such as HS and HA were tested. Finally, macrophages were subjected to hypoxia. MMP-9 production was above the control condition when macrophages were treated with LPS, HA, and hypoxia. Pre-treating the cells with Ado resulted in an exacerbation of MMP-9 secretion in all conditions tested, although this effect did not reach significance with fMLP (Figure 2). Together with data from Figure 1D, these results suggest that the effect of Ado on MMP-9 production appears to be independent of the presence of LPS, HA, fMLP, or hypoxia.

### 3.7 Adenosine modulates the Toll-like receptor-4 pathway

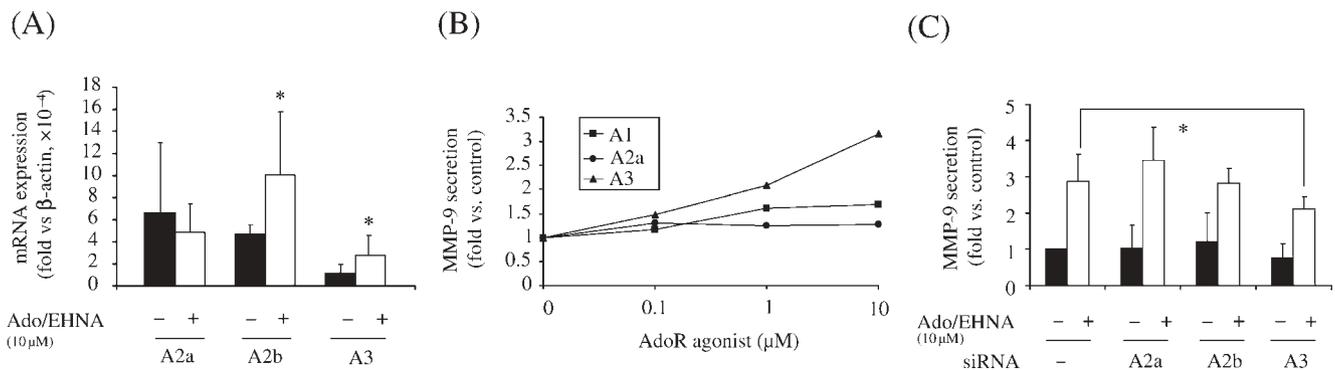
Since Ado enhanced MMP-9 production when macrophages were treated with LPS or endogenous activators of TLR4, we investigated the effects of Ado on the TLR4 pathway. LPS binds to TLR4 on the surface of macrophages, and a complex between LPS, TLR4, the receptor CD14, and the accessory protein MD-2 is formed. Quantitative PCR revealed that Ado induced a three-fold increase in MD-2 mRNA expression by macrophages (Figure 3A). CD14 and TLR4 are expressed on the cell surface or in the cytoplasm



**Figure 2** Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production by activated macrophages. THP-1 macrophages were treated by Ado as described in the figure. Then cells were treated with 100 ng/mL LPS,  $10^{-7}$  M fMLP, 10  $\mu$ g/mL hyaluronan (HA), 10  $\mu$ g/mL heparan sulfate (HS), or were incubated in hypoxia. For all conditions, MMP-9 concentration in conditioned media was measured by ELISA after 24 h. LPS, HA, and hypoxia enhanced MMP-9 production. Ado exacerbated MMP-9 secretion in all conditions tested. Results are mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. control, \*\* $P < 0.05$  vs. no Ado/EHNA.



**Figure 3** Adenosine (Ado) modulates the LPS recognition system. THP-1 macrophages were treated by Ado as described in *Figure 2*. (A) Quantitative PCR revealed that Ado increased MD-2 mRNA expression by macrophages, whereas CD14 and TLR4 expression remained unchanged ( $n = 6$ ). (B) Twenty-four hours after differentiation, cells were treated with 100 ng/mL LPS and were harvested 24 h later. Ado alone did not change the cell surface expression of TLR4 and CD14 but increased CD14 expression on LPS-treated macrophages ( $n = 3$ ). Results are mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.01$  vs. control.



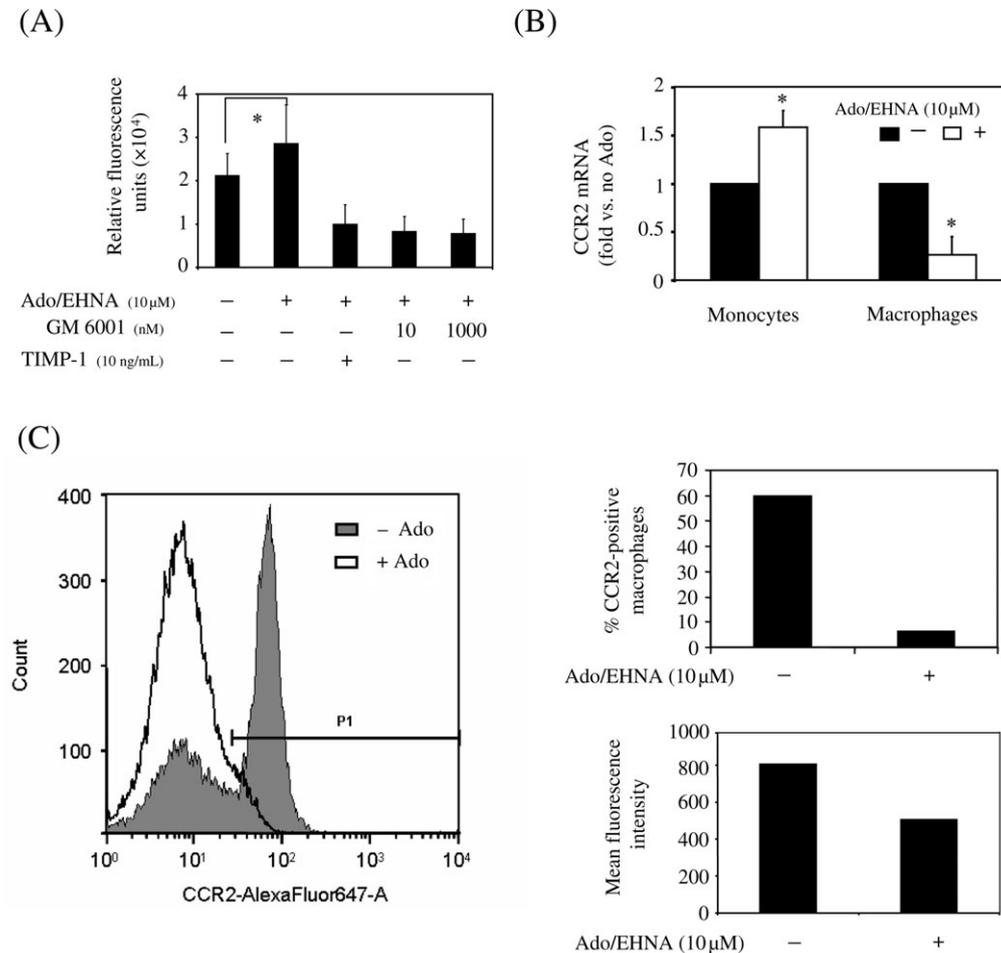
**Figure 4** Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production through its A3 receptor. (A) THP-1 macrophages were treated by Ado as described in *Figure 2*. Quantitative PCR revealed that A2a and A2b were the predominant forms of Ado receptors in macrophages. Ado induced a more than two-fold increase in A3 and A2b expression. Results are mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs. control. (B) THP-1 cells were treated for 15 min with 0.1, 1, or 10  $\mu$ M of Ado receptors agonists (CPA, A1-specific; CGS21680, A2a-specific; IB-MECA, A3-specific). EHNA was omitted to specifically study the effect of exogenous Ado. After 48 h of differentiation with 150 nM phorbol myristate acetate (PMA), gelatinase activity was assessed in conditioned medium. The A3 agonist mimicked the effect of Ado on MMP-9 secretion. The experiment was performed twice with similar results. (C) Cells were transfected with siRNA specific for A2a, A2b, or A3 Ado receptors, incubated for 48 h to achieve down-regulation of Ado receptors expression, treated for 15 min with 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M EHNA or vehicle before differentiation into macrophages with 150 nM PMA for 48 h. Conditioned medium was analysed by gelatin zymography. The A3-specific siRNA inhibits the Ado-mediated increase in MMP-9 secretion. Results are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Ado.

of macrophages, and cells can be primed by receptor exocytosis for further activation. Flow cytometry showed that Ado increases the expression of CD14, but not TLR4, on the cell surface in the presence of LPS (*Figure 3B*). Collectively, these data suggest that Ado primes macrophages for increased responsiveness to LPS through enhanced MD-2 and CD14 expression. This observation may explain why Ado exacerbates MMP-9 secretion by LPS-activated macrophages LPS (*Figure 2*).

### 3.8 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 production through its A3 receptor

To address which type of receptor mediates the effect of Ado on MMP-9 secretion, we used both pharmacological and molecular approaches. First, we determined the relative expression of each of the four Ado receptors by

macrophages. Quantitative PCR showed that receptors of the A2 type were the predominant form (*Figure 4A*). No A1 receptor mRNA was detected in our experiments. Ado induced a more than two-fold increase in A2b and A3 receptors expression. Secondly, experiments using agonists of Ado receptors showed that only the A3-specific agonist IB-MECA was able to increase MMP-9 secretion to the same extent than Ado (*Figure 4B*). This result has been confirmed in primary macrophages (see Supplementary material online, *Figure S3*). Finally, a genomic approach using siRNA specific for A2a, A2b, and A3 receptors was used. The specific down-regulation of Ado receptors by their respective siRNA was verified by quantitative PCR (data not shown). Zymography revealed that only the A3-specific siRNA was able to significantly inhibit the Ado-mediated increase in MMP-9 secretion (*Figure 4C*). Taken together, these results show that the A3 receptor mediates the effect of Ado on MMP-9 secretion.



**Figure 5** Ado increases monocytes migratory capacity. (A) THP-1 monocytes were treated for 24 h with 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M EHNA or vehicle before seeding on the microporous membrane of a modified Boyden chamber pre-coated with gelatin B. About 10 ng/mL MCP-1 was added in the bottom compartment. When specified, cells were pre-incubated with tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 (10 ng/mL) or GM6001 (10 nM or 1  $\mu$ M) before seeding on the membrane. Cell migration was quantified by fluorescence after 24 h. Ado enhanced cell migration and TIMP-1 or GM6001 prevented this effect. Results are mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. no Ado. (B) THP-1 monocytes and monocytes differentiated into macrophages by 150 nM PMA were treated for 24 h with 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M EHNA or vehicle before assessment of CCR2 mRNA expression by quantitative PCR. Ado enhanced CCR2 expression in monocytes and decreased CCR2 expression in macrophages. Results are mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. no Ado. (C) Ado decreases CCR2 expression in macrophages. Macrophages were treated for 6 h with 10  $\mu$ M Ado and 10  $\mu$ M EHNA or vehicle before assessment of CCR2 expression by flow cytometry. The P1 gate was used to determine the percentage of CCR2-positive cells. A representative experiment from three independent experiments is shown.

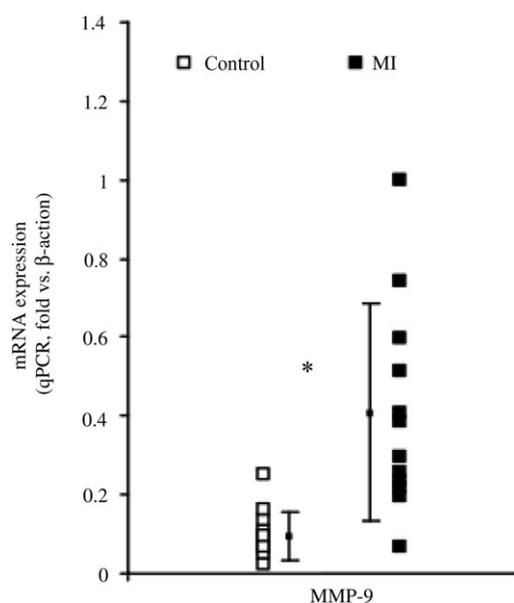
### 3.9 Adenosine improves monocyte migratory capacity

Infiltration of monocytes/macrophages into the myocardium post-MI is under the control of cell migration, which is facilitated by degradation of the ECM by MMP-9, and chemotaxis, which involves the binding of the chemokine MCP-1 to its cognate receptor CCR2. We therefore tested whether the increase in MMP-9 secretion by Ado could improve monocyte migration along a gradient of MCP-1. For this purpose, the top of a modified Boyden chamber was coated with gelatin B and MCP-1 was added in the bottom compartment. Monocytes were treated with Ado before seeding on the microporous membrane of the chamber. As shown in *Figure 5A*, Ado enhanced cell migration through the gelatin layer. This effect was inhibited by the synthetic MMP inhibitor GM6001 and the endogenous MMP-9 inhibitor TIMP-1 (*Figure 5A*). To test a potential effect of Ado on chemotaxis, CCR2 expression was measured by quantitative PCR. As shown in *Figure 5B*, Ado had opposite effects on CCR2 mRNA expression depending on the differentiation status

of monocytes. Ado increased CCR2 expression by monocytes (50% increase vs. control), whereas it decreased CCR2 expression by macrophages (75% inhibition vs. control). When assessed at the cell surface by flow cytometry, Ado also potentially reduced the expression of CCR2 on macrophages (*Figure 5C*). The mean fluorescence intensity of CCR2 staining was decreased by Ado from 800 to 500, and the percentage of cells expressing CCR2 was reduced by Ado from 60 to 6% (*Figure 5C*). Therefore, we concluded that Ado enhances monocytes migration through increased MMP-9 activity. In addition, our data suggest that the chemotactic capacity of macrophages is significantly attenuated by Ado through a loss of CCR2 expression.

### 3.10 Blood cells isolated from patients with acute myocardial infarction show enhanced matrix metalloproteinase-9 expression

Since Ado is massively released in the heart after MI, we hypothesized that blood cells isolated from patients the day of MI could express high levels of MMP-9. The PAXgene<sup>®</sup>



**Figure 6** Cells isolated from the blood of patients with acute myocardial infarction (MI) express more matrix metalloproteinase-9 mRNA than healthy controls. Blood samples from healthy volunteers (controls, open square) and patients with MI (filled square) were recovered in PAXgene<sup>®</sup> tubes. RNA was extracted and quantified by qPCR. Cells isolated from patients with MI have higher levels of MMP-9 than controls. Results were normalized to  $\beta$ -actin. Each square represents one patient and the means  $\pm$  SD ( $n = 12$  in each group) are displayed. \* $P < 0.0005$  vs. controls.

RNA blood system that allows RNA extraction of all blood cells from only 2.5 mL of blood was used in these experiments. This does not have a major impact on the accuracy of our results assuming that the monocytes/macrophages population is largely responsible for MMP-9 mRNA expression. Indeed, MMP-9 is also released in large amounts from neutrophils by degranulation, thus independent from *de novo* transcription.<sup>14</sup> Cells from MI patients expressed significantly more MMP-9 mRNA than controls (Figure 6). These observations suggest that the increased secretion of MMP-9 by monocytes/macrophages in the presence of Ado occurs during ischaemia post-acute MI.

A potential regulation of the expression of Ado receptors after MI has been tested in the same two groups of MI patients and healthy volunteers. As shown in the Supplementary material online, Figure S2, MI had no significant effect on the expression of Ado receptors.

#### 4. Discussion

The main finding of the present study is that, in sharp contrast to our previous observations in neutrophils, Ado enhances MMP-9 secretion by macrophages.

The fact that Ado prevents MMP-9 release by neutrophils whereas it enhances MMP-9 secretion by macrophages has several implications. Neutrophils are recruited to the infarct area early after MI (<2 days), whereas macrophages invade the lesion 2–4 days post-MI. The mechanisms responsible for MMP-9 production by these two cell types are fundamentally different. Neutrophils rapidly release large amounts of MMP-9 by degranulation. In our experiments, however, MMP-9 secretion by macrophages was not detected before 8 h, which is consistent with a *de novo* protein

synthesis. We previously demonstrated in neutrophils that Ado decreases MMP-9 secretion through the A2a receptor and this mechanism involved a quick signalling cascade with rapid  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization.<sup>10</sup> A recent study showed that hypoxia inhibits MMP-9 expression in monocyte-derived dendritic cells through the A2b receptor.<sup>15</sup> Data presented here show that enhancement of MMP-9 production by macrophages after exposure to Ado is mediated through A3 receptor activation and involves a transcriptional effect, although a contribution of the A2b receptor cannot be fully excluded. Therefore, the effects of Ado on MMP-9 production by inflammatory cells are highly dependent on the type of Ado receptors and their respective signalling pathways. This might have important implications for therapies using Ado analogues in the inflammatory context of MI or HF.

We also determined whether Ado was able to enhance MMP-9 production by activated macrophages. When macrophages were treated by the widely used superantigen LPS, a strong release of MMP-9 was observed and this effect was amplified by Ado. This observation suggests that macrophages can be primed by Ado for enhanced responsiveness to LPS. Our results showing that Ado increased MD-2 and CD14 expression are in accordance with this hypothesis. This priming mechanism appears to be different from the priming induced by oxidative stress that recruits TLR4 to the plasma membrane.<sup>16</sup> Whether these two mechanisms occur simultaneously following MI and result in exaggerated macrophage activation remains to be determined.

A direct link between TLR4 activation and the development of LV remodelling has recently been proven by Timmers *et al.*<sup>17</sup> However, the prototypical activator of TLR4, the bacterial product LPS, is probably absent in the heart after MI, suggesting that TLR4 must be activated by other endogenous ligands. Several ligands from diverse origins appear to be able to bind and activate TLR4, among which some are potentially present in the ischaemic heart. These include HS, which is involved in endothelial barrier integrity,<sup>18</sup> and HA, which is up-regulated in the kidney after ischaemia-reperfusion.<sup>19</sup> Our data show that LPS and HA significantly triggered MMP-9 production and that this effect was amplified by Ado. Interestingly, hypoxia was also able to induce MMP-9 production, reaching maximal levels after Ado treatment (four-fold increase). This observation suggests that Ado, which is massively released during ischaemia, is a potent stimulator of MMP-9 production in the ischaemic heart.

Chemotaxis and cell migration are two distinct processes that orchestrate monocytes tissue infiltration. The role of the main monocyte chemoattractant MCP-1 in LV remodelling is controversial since both beneficial<sup>20</sup> and deleterious<sup>21</sup> effects have been found in mice models. Interestingly, a study by Dewald *et al.*<sup>22</sup> highlighted the possibility that MCP-1 could, at the same time, promote healing of infarcted areas and contribute to LV remodelling. Two distinct subsets of monocytes have been identified in the murine infarcted heart: inflammatory monocytes bearing the CCR2 receptor are recruited during the early phase post-MI and monocytes lacking the CCR2 receptor and exhibiting healing properties are recruited during the late phase.<sup>23</sup> Our results reveal a dual effect of Ado on monocytes/macrophages. First, Ado improves monocyte migration through up-regulation of MMP-9 activity, and secondly, Ado favours healing macrophages to inflammatory macrophages through a loss of CCR2 expression.

We<sup>24</sup> and others<sup>25</sup> have shown that MMP-9 is a biomarker of HF after MI. Therefore, we compared MMP-9 expression in blood cells from patients with acute MI and healthy volunteers and we observed that cells from patients with acute MI had higher levels of MMP-9. This is probably due to a priming of the macrophages by the large amounts of Ado released in the ischaemic heart following MI. However, the exact contribution of Ado to this priming and the mechanisms involved in this potential priming remain to be determined.

A study with MMP-9 deficient mice revealed MMP-9 as a potential therapeutic target to prevent LV remodelling after MI.<sup>26</sup> However, the PREMIER (prevention of myocardial infarction early remodelling) phase II trial showed that non-specific inhibition of MMPs activity with PG-116800 failed to prevent LV remodelling and did not improve outcome after MI.<sup>4</sup> In this study, the MMP inhibitor was given 24–72 h post-MI. The negative results of this trial might be explained either by the non-specificity of the MMP inhibitor used or by the suboptimal timing of drug delivery. Further experimental work is necessary to fully understand the implication of MMPs in LV remodelling.

The therapeutic potential of Ado or Ado analogues has been reported in both animal studies and clinical trials. In animals, cardioprotective activities of Ado were found during three windows of opportunity: as a pre-treatment of ischaemia, during ischaemia, or during reperfusion. A dichotomy between the types of receptors involved was first hypothesized, A1 receptors mediating the cardioprotective effects of Ado during pre-treatment and during ischaemia, mainly through metabolic changes, and A2 receptors being beneficial during reperfusion, mainly through inhibition of neutrophil activity.<sup>27</sup> Our previous data supported the involvement of A2a receptors in the protection provided by Ado in post-ischaemic injury, through inhibition of MMP-9 release by neutrophils.<sup>10</sup> So far, most studies have shown that A3 receptor activation is cardioprotective before or during ischaemia.<sup>27,28</sup> This protection appears to be dose-dependent: mice with mild over-expression of A3 were partly protected from ischaemic injury whereas mice which highly over-expressed the A3 receptor developed a dilated cardiomyopathy.<sup>29</sup> It can be speculated that this phenomenon may partly be related to the stimulation of MMP-9 by the A3 receptor. Indeed, while low doses of MMP-9 may favour angiogenesis,<sup>30</sup> persistent high doses of MMP-9 will likely lead to matrix degradation and remodelling. Recent work by Feldman's group<sup>31</sup> demonstrated the association between a polymorphism in the coding region of the A3 receptor and the infarct size in a population of patients with ischaemic cardiomyopathy. However, this observation has to be confirmed in larger studies.

Few clinical trials have tested the therapeutic potential of Ado in the context of MI. Ado improved cardiac function of patients with MI when combined with lidocaine<sup>32</sup> or primary angioplasty.<sup>33,34</sup> However, these trials, although reporting a beneficial clinical outcome, were performed on a small number of patients. The AMISTAD I and II trials, with a larger sample size, demonstrated a reduction in infarct size by Ado as an adjunct to reperfusion therapy, when added early after infarction.<sup>35,36</sup> A *post hoc* analysis of the AMISTAD-II trial revealed that Ado reduced mortality when added within 3 h of infarction.<sup>37</sup> Of note, in this trial, Ado was administered for more than 48 h after MI. Based on our current findings, it can be speculated that

some of the early benefit of Ado was offset by stimulation of MMP-9 and migration of macrophages later on.

In conclusion, the Ado A3 receptor increases MMP-9 secretion by human monocytes/macrophages, in contrast to the A2a receptor that inhibits MMP-9 secretion by neutrophils. Therefore, therapy with Ado in the setting of ischaemic injury appears complex because the effects dramatically change with the type of receptor stimulated and the dosage. Since high doses of MMP-9, such as those released by neutrophils, may lead to matrix degradation, whereas moderate doses, such as those produced by monocytes/macrophages, may improve revascularization, our results suggest the testing of a dual therapeutic strategy with A2a agonists immediately after MI and A3 agonists during the remodelling phase.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Funding

Société pour la Recherche sur les Maladies Cardiovasculaires; Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of Luxembourg.

## Acknowledgements

We thank Céline Jeanty, Mélanie Vausort, Bernadette Leners, Christelle Nicolas, Malou Gloesener, and Loredana Jacobs for expert technical assistance. The help of Nicolaas Brons and Wim Ammerlaan with flow cytometry is acknowledged.

**Conflict of interest:** none declared.

## References

1. Kannel WB. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol* 2000;**53**:229–235.
2. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK *et al*. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;**347**:1397–1402.
3. Zannad F, Mebazaa A, Juilliere Y, Cohen-Solal A, Guize L, Alla F *et al*. Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute heart failure syndromes: the EFICA study. *Eur J Heart Fail* 2006;**8**:697–705.
4. Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, Brum J, Cusmano L, Krzeski P *et al*. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (prevention of myocardial infarction early remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:15–20.
5. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;**5**:247–264.
6. Willems L, Ashton KJ, Headrick JP. Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;**66**:245–255.
7. Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the failing human heart. *Circulation* 1998;**97**:521–524.
8. Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 1998;**82**:47–56.
9. Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM. Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol* 1999;**276**:H2141–H2147.
10. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Circ Res* 2006;**99**:590–597.

11. Funaya H, Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, Hori M. Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997;**95**:1363–1365.
12. Barnes CR, Mandell GL, Carper HT, Luong S, Sullivan GW. Adenosine modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 1995;**50**:1851–1857.
13. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001;**107**:789–800.
14. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J *et al.* Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001;**103**:2181–2187.
15. Zhao X, Li XG, Yang M, Shao Q, Wang D, Liu S *et al.* Hypoxia suppresses the production of MMP-9 by human monocyte-derived dendritic cells and requires activation of adenosine receptor A(2b) via cAMP/PKA signaling pathway. *Mol Immunol* 2008;**45**:2187–2195.
16. Powers KA, Szasz K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A *et al.* Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med* 2006;**203**:1951–1961.
17. Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans MJ *et al.* Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008;**102**:257–264.
18. Tang AH, Brunn GJ, Cascalho M, Platt JL. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol* 2007;**82**:282–285.
19. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM *et al.* TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007;**117**:2847–2859.
20. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE *et al.* Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2006;**99**:891–899.
21. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomoto T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003;**108**:2134–2140.
22. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T *et al.* CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005;**96**:881–889.
23. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007;**204**:3037–3047.
24. Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2006;**12**:66–72.
25. Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M *et al.* Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006;**12**:514–519.
26. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000;**106**:55–62.
27. Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ronson RS, Jordan JE, Zhao ZQ, Nakamura M *et al.* Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg* 1999;**68**:1942–1948.
28. Safran N, Shneyvays V, Balas N, Jacobson KA, Nawrath H, Shainberg A. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2001;**217**:143–152.
29. Black RG Jr, Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK *et al.* Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A3 adenosine receptor. *Circ Res* 2002;**91**:165–172.
30. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999;**5**:1135–1142.
31. Tang Z, Diamond MA, Chen JM, Holly TA, Bonow RO, Dasgupta A *et al.* Polymorphisms in adenosine receptor genes are associated with infarct size in patients with ischemic cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**82**:435–440.
32. Garratt KN, Holmes DR Jr, Molina-Viamonte V, Reeder GS, Hodge DO, Bailey KR *et al.* Intravenous adenosine and lidocaine in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1998;**136**:196–204.
33. Leeser MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty. *Circulation* 1997;**95**:2500–2507.
34. Marzilli M, Orsini E, Marraccini P, Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* 2000;**101**:2154–2159.
35. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF *et al.* Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**:1711–1720.
36. Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005;**45**:1775–1780.
37. Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J* 2006;**27**:2400–2405.



# Adenosine Reduces Cell Surface Expression of Toll-Like Receptor 4 and Inflammation in Response to Lipopolysaccharide and Matrix Products

Benjamin Haas · Frederique Leonard · Isabelle Ernens · Sophie Rodius ·  
Melanie Vausort · Magali Rolland-Turner · Yvan Devaux · Daniel R. Wagner

Received: 27 September 2010 / Accepted: 11 April 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Recent evidence suggests that Toll-like receptor 4 (TLR4) is not only involved in innate immunity but is also an important mediator of adverse left ventricular remodeling and heart failure following acute myocardial infarction (MI). TLR4 is activated by lipopolysaccharide (LPS) but also by products of matrix degradation such as hyaluronic acid and heparan sulfate. Although cardioprotective properties of adenosine (Ado) have been extensively studied, its potential to interfere with TLR4 activation is unknown. We observed that TLR4 pathway is activated in white blood cells from MI patients. TLR4 mRNA expression correlated with troponin T levels ( $R^2=0.75$ ;  $P=0.01$ ) but not with levels of white blood cells and C-reactive protein. Ado downregulated TLR4 expression at the surface of human macrophages ( $-50\%$ ,  $P<0.05$ ). Tumor necrosis factor- $\alpha$  production induced by the TLR4 ligands LPS, hyaluronic acid, and heparan sulfate was potently inhibited by Ado ( $-75\%$  for LPS,  $P<0.005$ ). This effect was reproduced by the A2A Ado receptor agonist CGS21680 and the non-selective agonist NECA and was inhibited by the A2A antagonist SCH58261 and the A2A/A2B antagonist ZM241,385. In contrast, Ado induced a 3-fold increase of TLR4 mRNA expression ( $P=0.008$ ), revealing the existence of a feedback mechanism to compensate for the loss of TLR4 expression at the cell surface. In conclusion,

the TLR4 pathway is activated after MI and correlates with infarct severity but not with the extent of inflammation. Reduction of TLR4 expression by Ado may therefore represent an important strategy to limit remodeling post-MI.

**Keywords** Adenosine · Inflammation · Toll-like receptor 4 · Myocardial infarction · Left ventricular remodeling

## Introduction

Myocardial infarction (MI) is associated with the development of an inflammatory response in the heart which largely influences the extent of left ventricular (LV) remodeling. Toll-like receptor 4 (TLR4), a member of the pattern-recognition receptors family, constitutes a key node in the induction and regulation of this inflammatory response. TLR4 expression is enhanced in the failing heart [1], and knockdown of TLR4 has been shown to reduce the extent of LV remodeling and to preserve systolic function without affecting infarct size [2]. TLR4-deficient mice showed less interstitial fibrosis in the non-infarcted area and increased collagen in the infarcted area. This was associated with lower levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and matrix metalloproteinases 2 and 9 [2]. Therefore, inhibition of TLR4 may represent a novel therapeutic approach for maladaptive LV remodeling. Of note, TLR4 binds not only to bacterial lipopolysaccharide (LPS) but also to products of extracellular matrix breakdown such as hyaluronic acid (HA) or heparan sulfate (HS) [3]. Increasing evidence implicates such endogenous TLR4 ligands as major triggers of inflammation in response to ischemia.

Adenosine (Ado) is massively released in the extracellular milieu after ischemia as a result of cell death and

B. Haas · F. Leonard · I. Ernens · S. Rodius · M. Vausort ·  
M. Rolland-Turner · Y. Devaux (✉)  
Laboratory of Cardiovascular Research,  
Centre de Recherche Public—Santé,  
120 route d'Arlon,  
1150 Luxembourg, Luxembourg  
e-mail: yvan.devaux@crp-sante.lu

D. R. Wagner  
Division of Cardiology, Centre Hospitalier,  
Luxembourg, Luxembourg

adenosine triphosphate breakdown [4]. Cardioprotective properties of Ado are known, and our previous studies suggested a role for Ado in cardiac repair and LV remodeling [5–7]. The aim of the present study was to determine the effect of Ado on TLR4. We observed that TLR4 is activated in acute MI patients and that Ado is able to limit this activation.

## Materials and Methods

**Patients** Twelve patients with acute MI enrolled in the Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry and treated with primary percutaneous coronary intervention were included in this study. Acute MI was defined by the presence of chest pain <12 h with significant ST elevation and positive cardiac enzymes. Blood samples were obtained at the time of mechanical reperfusion. All patients signed an informed consent, and the registry has been approved by local ethics committee. Creatine phosphokinase, high sensitivity C-reactive protein, and troponin T (TnT) were measured using standard laboratory techniques. Demographic and clinical data are summarized in Table 1. Twelve healthy volunteers were used as controls.

**Cell Culture** Cell culture materials were from Lonza (Verviers, Belgium), and all other materials and reagents were from Sigma (Bornem, Belgium) unless specified. Blood samples from healthy volunteers and MI patients dedicated to RNA analysis were harvested in PAXgene® blood RNA tubes (Qiagen, Hilden, Germany). PBMCs were isolated by Ficoll gradient. Monocytes were purified by negative selection using the Monocyte Isolation Kit II (Myltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) as described before [6]. Monocytes were cultured in RPMI 1640 containing L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, penicillin/streptomycin, and 1% fetal calf serum (Eurobio, Paris, France). Differentiation was achieved with 50 ng/mL M-CSF (Peprotech, Levallois-Peret, France) for 7 days. Cells from the THP-1 monocytic line cultured in the same medium were used for mechanistic investigations after differentiation to macrophages with 150 nM phorbol myristate acetate (PMA) for 24 h. Macrophages were preincubated for 15 min with Ado and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine hydrochloride to prevent Ado metabolism (10 µmol/L each). In some experiments, agonists (CGS21680, NECA) and antagonists (SCH58261, ZM241,385) of Ado receptors were used. LPS (from *Escherichia coli* 026:B6), HS (from bovine kidney), and HA were used as TLR4 agonists. Cells and conditioned medium were harvested and stored at –80°C until use. The absence of endotoxin contamination in Ado and other drugs

**Table 1** Clinical characteristics of MI patients (*n*=12)

Age, years (mean±SD)	58	18
Male, <i>n</i> (%)	11	92%
Body mass index (mean±SD)	28	4
Serum markers (mean±SD)		
CPK (units/L)	2,672	2,656
TnT (ng/mL)	3.9	3.8
hsCRP (ng/mL)	83	136
Cardiovascular history, <i>n</i> (%)		
Prior MI	3	25%
CABG	2	17%
PTCA	2	17%
Diabetes	2	17%
Hypertension	3	25%
Hypercholesterolemia	6	50%
Tobacco	5	42%
Medications, <i>n</i> (%)		
Beta-blockers	9	75%
Calcium antagonists	3	25%
Nitrates	4	33%
ACE inhibitors	2	17%
Statins	2	17%
Angiotensin inhibitors	0	0%
Blood count, % (mean±SD)		Range
Neutrophils	68.7±22.2	40–74%
Lymphocytes	19.3±15.7	19–48%
Monocytes	4.8±2.0	3.4–9%
Eosinophils	1.2±1.5	0–7%
Basophils	0.3±0.3	0–1.5%

All patients received aspirin, clopidogrel, heparin, and abciximab  
*ACE* angiotensin converting enzyme, *CABG* coronary artery bypass grafting, *CPK* creatine phosphokinase, *hsCRP* high-sensitive C-reactive protein, *PTCA* percutaneous transluminal coronary angioplasty, *TnT* troponin T

used in the study was verified using the E-Toxate® reagent from *Limulus polyphemus* (LAL assay having a detection sensitivity of 0.05 EU/mL).

**Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction** Total RNA from cultured cells was isolated using TriReagent® and the RNeasy® mini kit (Qiagen). Total RNA from blood cells collected in PAXgene® blood RNA tubes was isolated using PAXgene® Blood RNA Kit (Qiagen). Potential contaminating genomic DNA was digested by DNase I treatment (Qiagen). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). PCR primers were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) and were chosen to

encompass an intron. Primers were as follows: CD14 forward 5'-TAAAGCACTTCCAGAG-3' and reverse 5'-AATCTTCATCGTCCAG-3', MD-2 forward 5'-TGCCGAGGATCTGATGAC-3' and reverse 5'-ATTAGTTGGTGTAGGATGAC-3', TLR4 forward 5'-ATCCAGGTGTGAAATCCAGAC-3' and reverse 5'-AGGCTCCCAGGGCTAAAC-3', and  $\beta$ -actin forward 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' and reverse 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'. PCR was performed using the iCycler<sup>®</sup> and the IQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Biorad, Nazareth, Belgium); 1/10 dilutions of cDNA were used. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, 30 s at 95°C and 1 min annealing (40-fold). Optimal annealing temperature was determined for each primer pair. Melting point analysis was obtained after 80 cycles for 10 s from 55°C up to 95°C. Each run included negative reaction controls.  $\beta$ -actin was chosen as housekeeping gene for normalization. Expression levels were calculated by the relative quantification method ( $\Delta\Delta C_t$ ) using the Genex software (Biorad) which takes into account primer pair efficiency.

**Flow Cytometry** For intracellular staining, Brefeldin A (GolgiPlug<sup>™</sup>, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) was added in culture for the last 4 h of treatment in order to block the cytokine production in the Golgi apparatus prior to fixation and permeabilization (Cytofix/Cytoperm<sup>™</sup> Fixation/Permeabilization Solution, BD Biosciences). Cells were harvested using cell dissociation solution and washed once in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA). After Fc receptor blocking (Fc blocking Reagent, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany),  $2.10^5$  cells per determination were incubated at 4°C for 30 min in the dark with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-CD14-PE-Cy7 (clone M5E2, BD Biosciences), anti-CD45-Per-CP (clone 2D1, BD Biosciences), anti-TLR4-FITC (clone HTA125, Abcam, Cambridge, UK), anti-TNF- $\alpha$ -FITC (clone MAB11, eBioscience, San Diego, CA, USA), or proper isotype controls. Cells were analyzed on a BD FACSCanto<sup>™</sup> flow cytometer using FACSDiva<sup>™</sup> software (version 5.0.2); 20,000 events were acquired on FSC/SSC scatter plot gated cells and doublets were excluded on SSC-A/SSC-H scatter plot.

**Immunofluorescence** THP-1 monocytes were seeded onto glass coverslips and differentiated to macrophages during 2 days with 150 nM PMA. After Ado and LPS treatment, cells were fixed for 10 min in 2% paraformaldehyde, permeabilized for 10 min in PBS–1% Tween in case of intracellular staining, and blocked for 1 h in PBS–3% BSA. Cells were then incubated

with a rabbit polyclonal antibody anti-TLR4 (sc-10741, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), followed by incubation with Alexa Fluor<sup>®</sup>568 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes). Pictures were collected either on a fluorescence microscope (Leica DMIL) with a  $\times 100$  oil immersion objective and a Leica DFC300 FX camera using the Leica LAS V3.0 software, or on a confocal fluorescence microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510) with a  $\times 63$  oil immersion objective using the LSM 510 META software. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (blue) staining was used to reveal nuclei.

**Immunoblotting** Total proteins were extracted after homogenization of cells on ice with cell lysis buffer (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands) added with protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride. Supernatants were collected after centrifugation at  $800\times g$  for 5 min at 4°C and were passed ten times through a 26-gauge needle. Samples were then clarified by centrifugation at  $12,000\times g$  for 15 min at 4°C. Protein concentrations were determined using BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Aalst, Belgium). Proteins were separated on 4–8% polyacrylamide gels, transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Brussels, Belgium). Membranes were incubated with a polyclonal rabbit anti-mouse TLR4 antibody (sc-10741, Santa Cruz Biotechnology) and donkey anti-mouse IgGs coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). A mouse monoclonal anti human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (clone 0411, Santa Cruz Biotechnology) was used for normalization. Substrate used was the Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Images were captured on a Kodak Gel Logic 2200 Station (Raytest, Straubenhardt, Germany), and quantification was performed using the AIDA software.

**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium was measured by ELISA using the Quantikine DTA00C kit (R&D Systems, Oxon, UK). Samples were assayed in duplicates. Detection limit of the assay was 1.6 ng/mL.

**Statistical Analysis** Results are expressed as mean $\pm$ SD. Analyses were performed with SigmaPlot v11.0. Comparisons between two groups were performed with *t* test for data with a Gaussian distribution. Mann–Whitney (unpaired data) or Wilcoxon (paired data) tests were used for non-Gaussian data. One-way repeated measures ANOVA was used to compare multiple paired groups. Correlations were evaluated using the Spearman test. A *P* value < 0.05 was considered significant.

## Results

### Expression of TLR4 Is Enhanced After MI

We measured mRNA expression levels of TLR4 and its associated proteins CD14 and MD-2 in whole blood cells obtained from 12 patients with acute MI and 12 healthy volunteers. Gene expression was assessed using the PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA system and quantitative PCR. TLR4, MD-2, and CD14 were expressed at significantly higher levels in cells isolated from patients with acute MI than in cells from healthy controls (Fig. 1A). Levels of TLR4 positively correlated with that of TnT ( $R^2=0.75$ ;  $P=0.01$ ) but not with the levels of white blood cells or CRP (Fig. 1B)

### Adenosine Downregulates TLR4 Expression

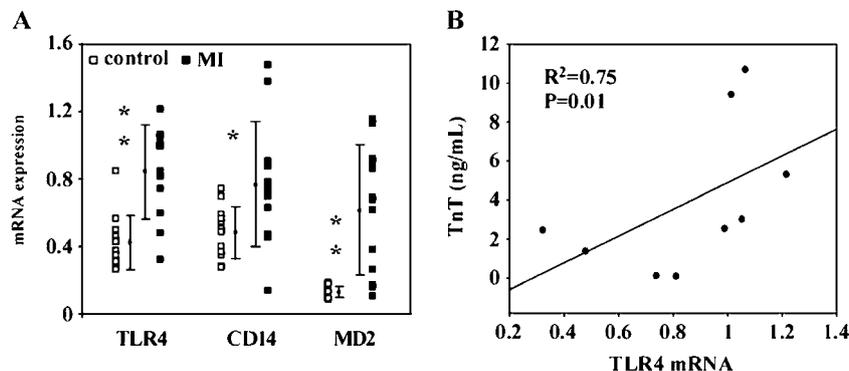
Monocytes differentiating to macrophages during tissue infiltration are responsible for a large part of the inflammatory reaction in the infarcted heart. We isolated primary blood monocytes from healthy volunteers and differentiated the cells into macrophages by M-CSF. TLR4 expression at the surface of macrophages was analyzed by flow cytometry 24 h after activation. LPS decreased TLR4 expression at the cell surface, and this observation was in line with the notion that TLR4 is internalized after exposure to LPS. Addition of LPS and Ado further diminished the expression of TLR4, reaching a 50% inhibition. However, Ado alone had no effect on the expression of TLR4 (Fig. 2A). A kinetic of TLR4 surface expression revealed that the decrease of TLR4 after LPS exposure was maximal at 24 h and returned to baseline levels at 48 h. This effect was amplified by Ado both at 24 and 48 h (Fig. 2B). We further investigated

whether Ado alone was able to downregulate TLR4 surface expression. We observed a rapid decrease of TLR4 expression following addition of Ado, starting as early as 1 min and reaching statistical significance after 20 min (Fig. 2C). LPS also decreased TLR4 expression, but this effect was slower, reaching significance after 60 min (Fig. 2C). The loss of cell surface expression of TLR4 following Ado and LPS treatment was confirmed by immunofluorescence in macrophages derived from the human monocytic cell line THP-1 (Fig. 2D). All together, these results show that Ado downregulates cell surface expression of TLR4.

### Adenosine Decreases TNF- $\alpha$ Production

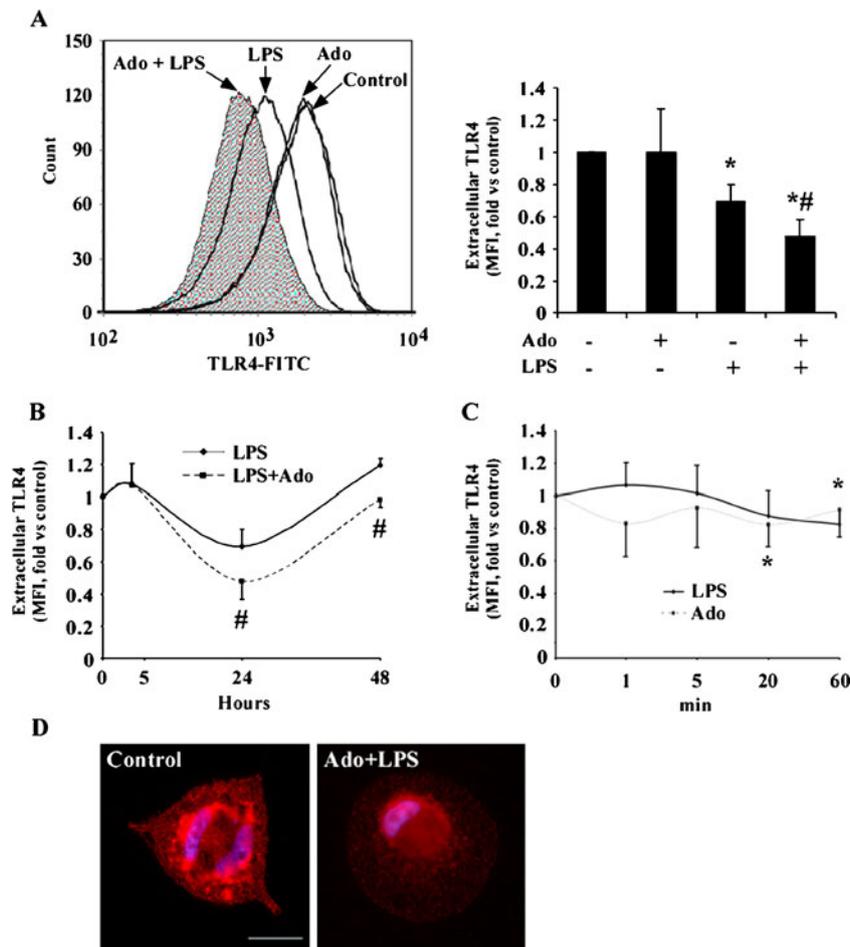
The main consequence of the activation of the TLR4 pathway is the release of pro-inflammatory cytokines, most notably TNF- $\alpha$ . We tested whether the decrease of TLR4 surface expression by Ado could affect TNF- $\alpha$  production by macrophages from healthy volunteers. When TNF- $\alpha$  was measured intracellularly by flow cytometry, we observed that Ado inhibited TNF- $\alpha$  expression in LPS-activated macrophages (Fig. 3A).

So far, experiments were performed with LPS as prototypical TLR4 ligand. However, LPS is a component of the bacterial wall of gram negative bacteria and is not likely to be present in the heart after MI. Therefore, we also tested whether Ado regulates TNF- $\alpha$  production by macrophages when TLR4 is activated by endogenous ligands likely to be present in the heart after acute MI, such as HA and HS, which are products of the breakdown of the extracellular matrix. All three TLR4 agonists—LPS, HA, and HS—potently induced TNF- $\alpha$  secretion, and this effect was blunted by Ado (Fig. 3B). For instance, TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium of macrophages



**Fig. 1** Expression of TLR4 components is enhanced in MI patients compared with healthy volunteers. **A** Blood samples from healthy volunteers (controls, *open square*) and patients with MI (*closed square*) were recovered in PAXgene<sup>®</sup> tubes. RNA was extracted and quantitative PCR were performed on selected genes. Cells isolated from MI patients have higher levels of TLR4, CD14, and MD2 than cells isolated from

controls. Results were normalized to  $\beta$ -actin. Each *square* represents one patient and the means $\pm$ SD ( $n=12$  in each group) are displayed. \* $P<0.01$  vs controls; \*\* $P<0.0005$  vs controls. **B** Peak TnT values are correlated to TLR4 mRNA expression values. TnT values were available for nine patients, and TLR4 expression was determined by quantitative PCR. Correlation coefficient and  $P$  value are indicated



**Fig. 2** Ado and LPS downregulate cell surface expression of TLR4. **A** Monocytes were isolated from PBMCs of healthy volunteers by negative selection and were differentiated to macrophages with 50 ng/mL M-CSF for 7 days. Macrophages were preincubated for 15 min with 10  $\mu$ mol/L Ado before incubation for 24 h with LPS 100 ng/mL. TLR4 expression at the cell surface was measured by FACS. LPS reduced cell surface expression of TLR4 and Ado exacerbated this effect. *Left panel* displays a representative histogram, and *right panel* shows the mean fluorescence intensities normalized to control condition. **B**, **C** Kinetics of TLR4 surface expression on primary macrophages treated by 10  $\mu$ mol/L Ado and/or 100 ng/mL LPS for different periods of time. In LPS- and Ado-treated cells, Ado was added 15 min prior to LPS. TLR4 expression was measured by FACS.

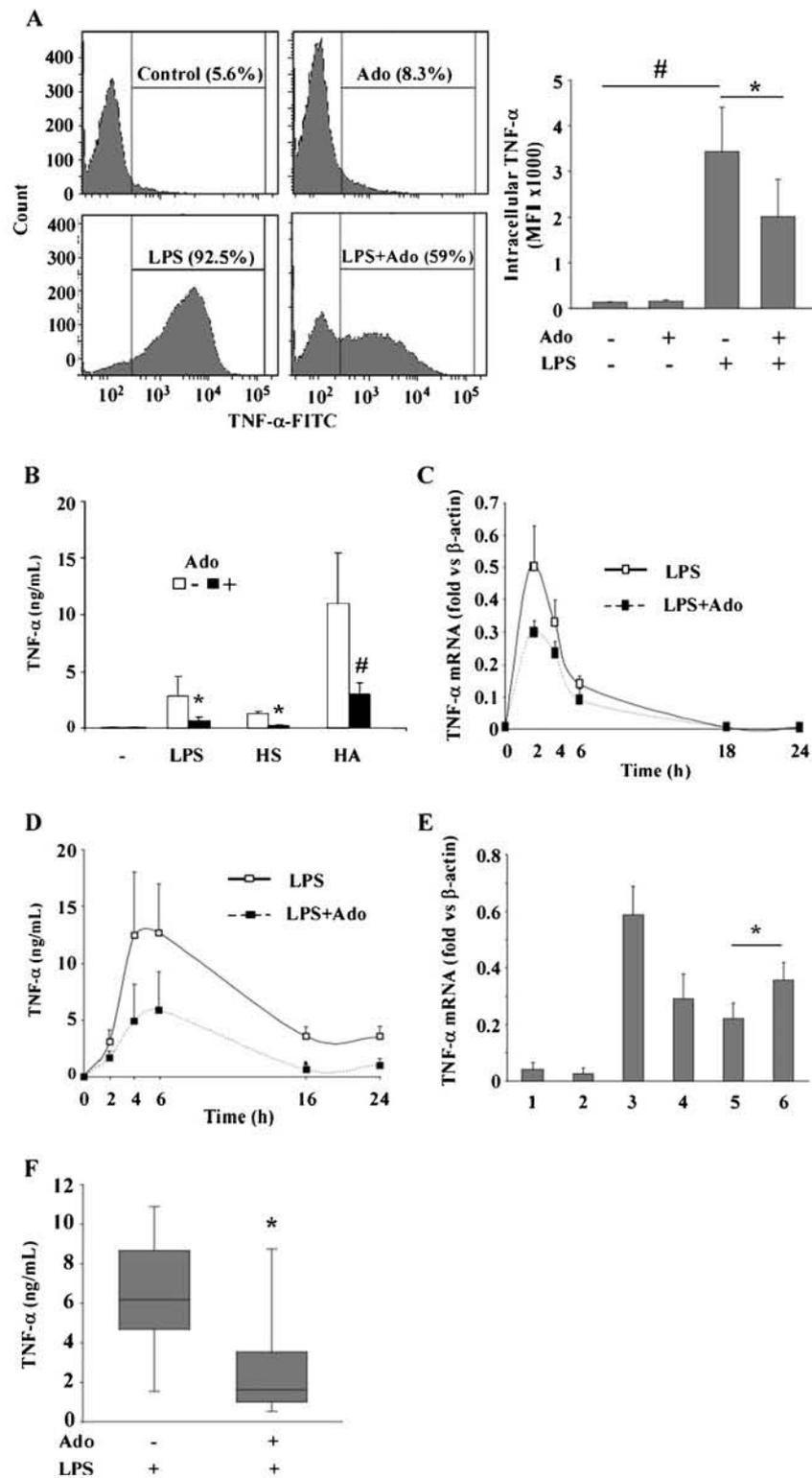
TLR4 cell surface expression was decreased 24 h after LPS administration (*full line*) and returned to basal levels at 48 h ( $P=0.01$ ). Ado exacerbated this decrease (*dotted line*). Ado induced a rapid decrease of TLR4 expression and the decrease observed with LPS was slower. Results are mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. \* $P<0.05$  vs control; # $P<0.05$  vs LPS. **D** Cells from the THP-1 monocytic line were differentiated in vitro to macrophages by 150 nM PMA for 24 h. Macrophages were preincubated for 15 min with 10  $\mu$ mol/L Ado before incubation with 100 ng/mL LPS for 24 h. As determined by immunofluorescence, cell surface TLR4 expression was downregulated after treatment by Ado and LPS. Representative pictures of three randomly taken pictures per condition are shown. *Bar scale*, 20  $\mu$ m

stimulated by LPS was decreased by >75% in the presence of Ado ( $P<0.005$ ; Fig. 3B). These results demonstrate that the effect of Ado on TLR4 is not specifically related to activation by LPS but is also active in the presence of fragments of the extracellular matrix.

The effect of Ado on TNF- $\alpha$  production appeared to involve transcriptional mechanisms since Ado downregulated TNF- $\alpha$  mRNA expression induced by LPS (Fig. 3C). The peak of TNF- $\alpha$  mRNA (2 h after LPS) preceded the peak of TNF- $\alpha$  protein measured in conditioned medium (4–6 h after LPS; Fig. 3D). When added 20 min after LPS challenge, Ado less potently inhibited TNF- $\alpha$  expression

than when added before LPS, suggesting that Ado affects TLR4 activation (Fig. 3E).

Next, we investigated the effect of Ado in cells from MI patients. Blood monocytes from 12 MI patients were purified, differentiated to macrophages, and treated with Ado and LPS. As observed with macrophages from healthy volunteers (Fig. 3B), Ado treatment potently inhibited the accumulation of TNF- $\alpha$  in conditioned medium ( $\sim 70\%$ ,  $P<0.001$ , Fig. 3F). It has to be noted that macrophages from MI patients secreted about 2-fold more TNF- $\alpha$  than the cells obtained from healthy volunteers (Fig. 3F), presumably secondary to in vivo priming.

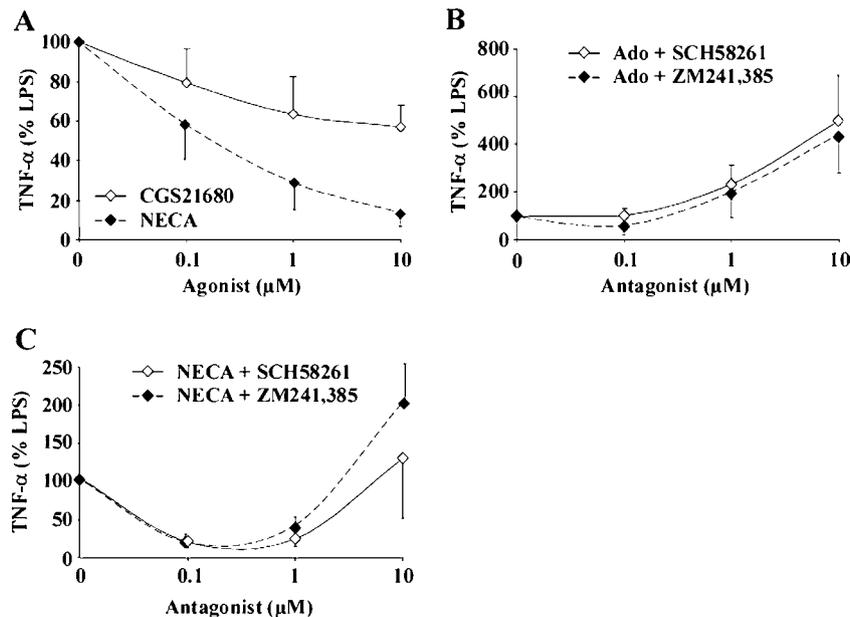


### Activation of A2A and A2B Receptors Inhibits TNF- $\alpha$ Production

Since the A2A is the predominant form of Ado receptors at the surface of activated macrophages [5, 7], we tested

whether specific activation or blockade of this receptor could reproduce the effect of Ado on TNF- $\alpha$ . In the presence of LPS, the A2A receptor agonist CGS21680 dose-dependently inhibited the release of TNF- $\alpha$ , and this inhibition was more robust in presence of the non-specific

**Fig. 3** Adenosine inhibits TLR4-induced TNF- $\alpha$  production. Monocytes were isolated from PBMCs of healthy volunteers by negative selection. Macrophages were obtained by differentiation of monocytes with 50 ng/ml M-CSF for 7 days. Cells were preincubated for 15 min with Ado (10  $\mu$ mol/L) before incubation for 24 h with LPS (100 ng/mL), HS (50  $\mu$ g/mL), or HA (50  $\mu$ g/mL). Intracellular TNF- $\alpha$  was assessed by flow cytometry, TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium was measured by ELISA, and TNF- $\alpha$  mRNA expression was assessed by quantitative PCR. **A** Ado reduced the LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  in macrophages. The vertical bars discriminate TNF- $\alpha$ -secreting cells from non-secreting cells, and the percentage of cells positive for TNF- $\alpha$  is indicated. Mean fluorescence intensities graphed on right panel indicate that Ado inhibits the intracellular accumulation of TNF- $\alpha$  induced by LPS. Mean values  $\pm$  SD from three independent experiments are shown. \* $P$ <0.05 vs LPS; # $P$ <0.001 vs control. **B** Ado significantly inhibited TNF- $\alpha$  accumulation in conditioned medium induced by LPS, HS, or HA. Data are mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ). \* $P$ <0.005 vs no Ado; # $P$ <0.05 vs no Ado. **C** TNF- $\alpha$  mRNA expression was triggered as early as 2 h following LPS challenge, returned to baseline levels after 6 h, and was inhibited by Ado pretreatment. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). **D** TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium was maximal after 4 h of LPS treatment and was inhibited by Ado pretreatment. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=5$ ). **E** TNF- $\alpha$  mRNA expression was measured 2 h after treatment with vehicle (1), Ado (2), LPS (3), Ado and LPS added at the same time (4), Ado added 20 min before LPS (5), and Ado added 20 min after LPS (6). Addition of Ado 20 min after LPS resulted in a lower inhibition of TNF- $\alpha$  expression than when Ado was added before LPS. \* $P$ <0.01. **F** Monocytes isolated from the blood of patients with acute MI were differentiated to macrophages and treated with Ado and/or LPS for 24 h as described above. Ado downregulated TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium. Results are compiled from 12 MI patients. \* $P$ <0.001 vs control



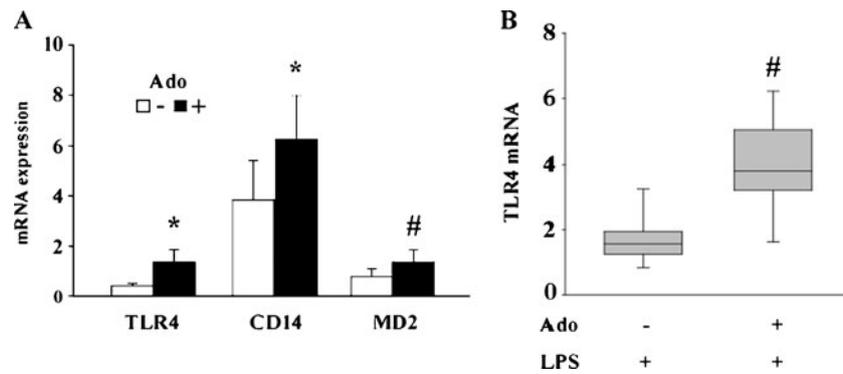
**Fig. 4** The A2A Ado receptor inhibits TNF- $\alpha$  production. Macrophages obtained by differentiation of blood monocytes from healthy volunteers were treated with agonists and antagonists of Ado receptors. Agonists were added 15 min before LPS challenge (100 ng/mL). Antagonists were added 15 min before Ado or NECA (10  $\mu$ mol/L). Harvesting was performed 24 h after addition of LPS. TNF- $\alpha$  concentration in conditioned medium was assessed by ELISA.

agonist NECA (Fig. 4A). The antagonists SCH58261 (A2A-specific) and ZM241,385 (A2A/A2B-specific) reversed the inhibition of TNF- $\alpha$  production induced by Ado (Fig. 4B). In NECA-treated cells, only high concentrations of SCH58261 and ZM241,385 were able to blunt the effect of NECA (Fig. 4C). These data demonstrate that A2-type Ado receptors are potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production.

#### Adenosine Enhances TLR4 mRNA Expression by Macrophages

Using quantitative PCR, we measured the mRNA expression of components of the LPS recognition system in macrophages from both healthy volunteers and patients with MI treated by LPS and/or Ado for 24 h. In contrast to the effect observed at the protein level, we found that Ado increased mRNA levels of TLR4 in macrophages from healthy volunteers (3-fold,  $P=0.008$ ; Fig. 5A). This increase was paralleled by increases of CD14 and MD2 mRNAs (Fig. 5A). Ado also reproducibly enhanced TLR4 mRNA in macrophages from MI patients (>2-fold,  $P<0.001$ ; Fig. 5B). These data suggest that this increase of TLR4 mRNA expression is a feedback mechanism to compensate for the loss of TLR4 at the cell surface.

**A** The Ado receptor agonists CGS21680 and NECA decreased the LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion. **B** The antagonists SCH58261 and ZM241,385 reversed the effect of Ado on TNF- $\alpha$  production. **C** High concentrations of SCH58261 and ZM241,385 reversed the effect of NECA on TNF- $\alpha$  production. Results are expressed as percentage of LPS-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. All effects were significant with  $P$  values <0.05



**Fig. 5** Ado upregulates TLR4 mRNA expression. Macrophages isolated from PBMCs of healthy volunteers and patients with acute MI were differentiated to macrophages before treatment with 10  $\mu$ mol/L Ado or vehicle for 15 min and challenge by 100 ng/mL LPS for 24 h. TLR4, CD14, and MD2 mRNA expression was measured by

quantitative PCR. **A** Ado enhanced the expression of all three mRNAs in macrophages from healthy volunteers. **B** Ado also enhanced TLR4 mRNA expression in macrophages from MI patients. Results were normalized to  $\beta$ -actin and are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=8$  for **A** and  $n=12$  for **B**). \* $P<0.01$  vs control; # $P<0.001$  vs control

### Adenosine Does Not Regulate Total TLR4 Protein Expression

To examine the effects of Ado on TLR4 protein levels, immunoblotting experiments were performed on whole cell extracts of THP-1 and primary macrophages treated by Ado for 15 min and then by LPS for different time periods. No significant effect was observed (Fig. 6).

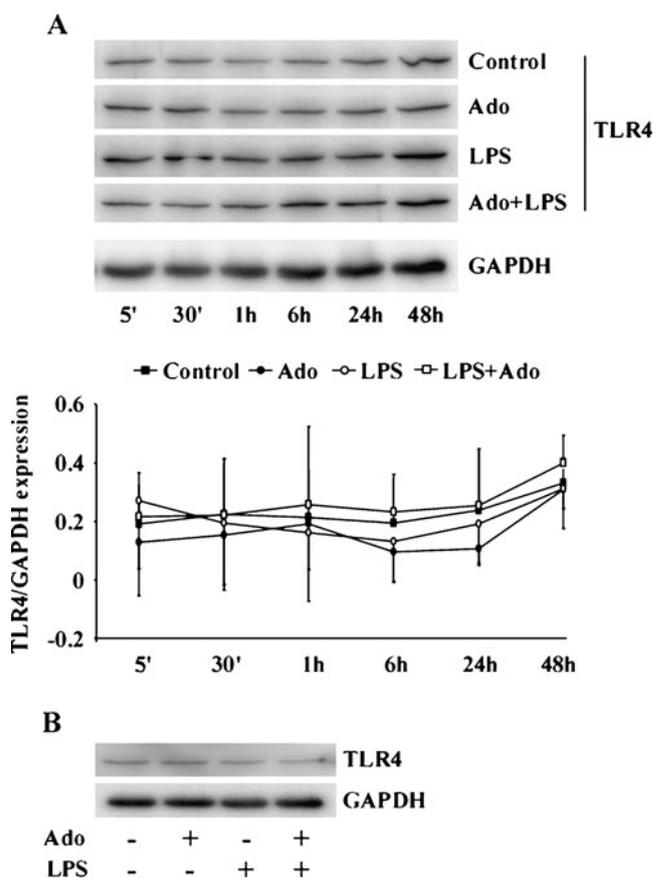
### Adenosine Quickly Downregulates TLR4 Surface Expression

The experiments showing an inhibition of TNF- $\alpha$  mRNA expression after 2 h of LPS challenge (Fig. 3C) incited us to investigate a potential rapid effect of Ado on TLR4 expression. THP-1 macrophages were treated by Ado for 15 min and imaged by a confocal fluorescence microscope. Macrophages displayed a clear expression of TLR4 at their surface under control conditions and Ado highly reduced this extracellular expression. In contrast, Ado did not modify intracellular TLR4 expression (Fig. 7). These results show that Ado is able to quickly decrease TLR4 availability at the cell surface.

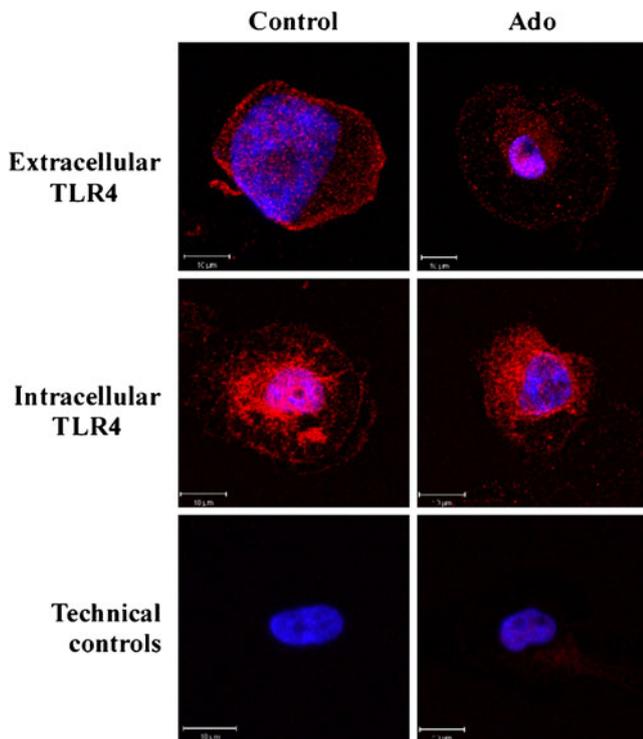
## Discussion

The main finding of the present study is that Ado downregulates the expression of TLR4 at the cell surface of macrophages. This effect is present in cells from patients with acute MI and leads to a reduced inflammatory response to breakdown products of the extracellular matrix.

Comparing healthy volunteers and MI patients, we found that TLR4, CD14, and MD2, the three components of the LPS-recognition system, were significantly more expressed in blood cells from MI patients than in healthy volunteers.



**Fig. 6** Ado does not regulate total TLR4 protein expression. TLR4 protein expression was assessed in whole cellular extracts by immunoblotting. GAPDH was used as loading control. **A** THP-1 monocytes were differentiated to macrophages by 150 nM PMA for 24 h and were treated with 10  $\mu$ mol/L Ado for 15 min before challenge with 100 ng/mL LPS for indicated period of times. *Upper panel* representative pictures. *Lower panel* quantification results showing a constant level of TLR4. TLR4 expression was normalized to GAPDH. Results are mean  $\pm$  SD from three independent kinetics. **B** Primary human macrophages obtained from PBMCs of healthy volunteers were treated by 10  $\mu$ mol/L Ado and 100 ng/mL LPS for 24 h. TLR4 expression was similar among groups. A representative experiment of two is shown



**Fig. 7** Ado rapidly decreases TLR4 surface expression. THP-1 monocytes were differentiated to macrophages by 150 nM PMA for 24 h and were treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  Ado for 15 min. As determined by confocal microscopy, extracellular TLR4 expression was down-regulated by Ado. Intracellular expression remained unaffected. Technical controls performed without primary antibodies attested for the specificity of TLR4 staining. Representative pictures of six randomly taken pictures per condition are shown. Bar scale, 10  $\mu\text{m}$

These observations show that activation of TLR4 pathway after MI can be evidenced by transcriptomic profiling of blood cells, in accordance with a previous report [8]. The enhanced activation of TLR4 pathway in MI patients is not consecutive to increased number of circulating leukocytes or monocytes. Also, TLR4 expression was not correlated to blood cells numbers, and MI patients had similar monocyte frequencies (3.4% to 9%) to healthy volunteers (4% to 12%). Therefore, our data suggest that activation of TLR4 shortly after MI is not a non-specific consequence of activation of inflammation. The strong correlation between TLR4 and TnT indicates that TLR4 activation reflects the amount of myocardial injury. These results are contradictory with data from TLR4 knockout mice where infarct size remained unaffected [2].

Inflammation significantly contributes to LV remodeling after MI. Several lines of evidence indicate that Ado may be cardioprotective in the setting of MI, not only through its anti-inflammatory properties, which have been extensively characterized by several groups including ours, but also through direct interaction with regulators of extracellular matrix turnover [6, 7]. In this study, we report that Ado directly affects TLR4 activation, a major trigger of

inflammation. TLR4 is abundantly expressed in the heart [1] where it participates to the inflammatory response to ischemic injury. Genetic ablation of TLR4 [9] or administration of a TLR4 inhibitor [10] protects mice from myocardial ischemia–reperfusion injury and decreases LV remodeling after MI [2]. In studies by Oyama and colleagues [9] and Shimamoto and colleagues [10], infarct size was reduced in the absence of TLR4 activation, whereas in the study of Timmers and colleagues [2], infarct size was unaffected by TLR4 deficiency. This discrepancy most probably comes from the different experimental protocol used, i.e., ischemia/reperfusion [9] vs. permanent occlusion [2]. Together, these studies suggest that TLR4 is deleterious both during the early phase after ischemia/reperfusion and during the later phase of remodeling. Our results strengthen these findings, identify macrophages as mediators of the deleterious effects of TLR4 activation, and suggest that Ado, or better A2A agonists, may be used to circumvent this activation and prevent or limit LV remodeling.

Toll-like receptor function is tightly regulated by compartmentalization [11]. Upon ligand binding, TLR4 is endocytosed, resulting in internalization and delivery to endolysosomes where it is degraded [12]. This avoids excessive activation of the inflammatory response and links innate to adaptive immunity. Our data showing that Ado decreases cell surface expression of TLR4 is consistent with receptor internalization. Also, the observation that the inhibition of TNF- $\alpha$  expression by Ado is less robust when added after than before LPS is consistent with a reduction of TLR4 availability for activation at the cell surface. The absence of modifications of total TLR4 protein expression observed by immunoblotting, together with increased TLR4 mRNA expression after Ado treatment, suggest that the loss of TLR4 at the cell surface is followed by an increase in TLR4 gene transcription. Such a compensatory mechanism may limit the beneficial effect of Ado.

A synergism between Ado receptors and TLR4 has previously been reported. Indeed, stimulation of both the A2A receptor and TLR4 appear to result in increased production of vascular endothelial growth factor production and decreased production of TNF- $\alpha$ , a mechanism described as the angiogenic switch [13, 14]. The present study may provide an explanation for the decrease of TNF- $\alpha$ , namely through internalization of TLR4, which is amplified in the presence of both LPS and Ado.

To demonstrate that the effect of Ado on TLR4 reported here is relevant in the setting of MI, we also stimulated macrophages with endogenous ligands of TLR4 which are potentially present in the heart after MI, such as HS and HA. HS is an endogenous TLR4 ligand involved in endothelial barrier integrity [15] and HA is upregulated in the kidney after ischemia–reperfusion [16]. Since Ado

inhibited TNF- $\alpha$  production in the presence of both agonists, we conclude that the interference with TLR4 demonstrated in this study is not specific to LPS and is applicable to the inflammatory mechanism in the heart. In addition, we verified that this anti-inflammatory effect was effectively present in macrophages isolated from patients with acute MI.

We identified the A2A and A2B receptors as mediators of the anti-inflammatory effects of Ado. This is consistent with previous data showing that the A2A and A2B receptors, but not the A3 receptor, mediate the inhibition of TNF- $\alpha$  release by murine macrophages [17]. In contrast, several *in vitro* and *in vivo* studies reported that the A3 receptor was also able to inhibit TNF- $\alpha$  release [18–20]. This discrepancy is certainly attributable to cell and species specificities of Ado effects [21] and illustrates the necessity to study human primary cells. Most of the effects of Ado on TNF- $\alpha$  reported so far have been evidenced from murine models or human cell lines [18, 22–25]. Our present data show for the first time in human primary macrophages that Ado, through activation of A2A and A2B receptors, is a robust inhibitor of TNF- $\alpha$  production.

Lipopolysaccharide is known to induce A2A receptor expression in macrophages [5, 7, 26]. The inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  have been shown to increase A2A expression in these cells [27]. The fact that TNF- $\alpha$  increases A2A expression, which in turn inhibits TNF- $\alpha$  production, appears as a compensatory mechanism aimed at limiting potential over-activation of the inflammatory response. In addition, TNF- $\alpha$  has been shown to prevent A2A receptor desensitization induced by Ado, resulting in an amplification of the inhibition of TNF- $\alpha$  by Ado [28]. Our results showing that Ado downregulates TLR4 complicate things further and indicate that the interaction between TNF- $\alpha$  production and Ado is a complex phenomenon involving several regulatory loops, among which a direct limitation of TLR4 availability at the cell surface by Ado.

In conclusion, we have shown that Ado induces a reduction of TLR4 expression at the surface of human macrophages, resulting in a robust inhibition of TNF- $\alpha$  production. This mechanism may be important to limit the activation of TLR4 in response to injury to the extracellular cardiac matrix.

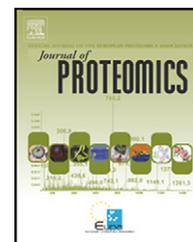
**Acknowledgments** We thank Christelle Nicolas, Bernadette Leners, Céline Jeanty, Malou Gloesener, and Loredana Jacobs for expert technical assistance. The help of Nicolaas Brons and Wim Ammerlaan with flow cytometry is acknowledged. This study was in part supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. B.H. and F.L. are recipients of fellowships from the National Funds of Research of Luxembourg.

## References

- Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y. D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R. T., et al. (1999). Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *Journal of Clinical Investigation*, *104*, 271–280.
- Timmers, L., Sluijter, J. P., van Keulen, J. K., Hofer, I. E., Nederhoff, M. G., Goumans, M. J., et al. (2008). Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circulation Research*, *102*, 257–264.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., & Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, *13*, 552–559.
- Velot, E., Berne, R. M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *The American Journal of Physiology*, *204*, 317–322.
- Ernens, I., Leonard, F., Vausort, M., Rolland-Turner, M., Devaux, Y., & Wagner, D. R. (2010). Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *392*, 351–356. doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.023.
- Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y., & Wagner, D. R. (2006). Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca2+ pathway. *Circulation Research*, *99*, 590–597.
- Velot, E., Haas, B., Leonard, F., Ernens, I., Rolland-Turner, M., Schwartz, C., et al. (2008). Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovascular Research*, *80*, 246–254.
- Satoh, M., Shimoda, Y., Maesawa, C., Akatsu, T., Ishikawa, Y., Minami, Y., et al. (2006). Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, *109*, 226–234.
- Oyama, J., Blais, C., Jr, Liu, X., Pu, M., Kobzik, L., Kelly, R. A., et al. (2004). Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*, *109*, 784–789.
- Shimamoto, A., Chong, A. J., Yada, M., Shomura, S., Takayama, H., Fleisig, A. J., et al. (2006). Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury. *Circulation*, *114*, 1270–1274.
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews. Immunology*, *9*, 535–542. doi:10.1038/nri2587.
- Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., et al. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO Journal*, *25*, 683–692. doi:10.1038/sj.emboj.7600991.
- Macedo, L., Pinhal-Enfield, G., Alshits, V., Elson, G., Cronstein, B. N., & Leibovich, S. J. (2007). Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice. A role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors. *The American Journal of Pathology*, *171*, 1774–1788.
- Pinhal-Enfield, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S. N., Salzman, A. L., Boons, G. J., et al. (2003). An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *The American Journal of Pathology*, *163*, 711–721.
- Tang, A. H., Brunn, G. J., Cascalho, M., & Platt, J. L. (2007). Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, *82*, 282–285.
- Wu, H., Chen, G., Wyburn, K. R., Yin, J., Bertolino, P., Eris, J. M., et al. (2007). TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, *117*, 2847–2859.

17. Kreckler, L. M., Wan, T. C., Ge, Z. D., & Auchampach, J. A. (2006). Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *317*, 172–180.
18. Martin, L., Pingle, S. C., Hallam, D. M., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2006). Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *316*, 71–78.
19. McWhinney, C. D., Dudley, M. W., Bowlin, T. L., Peet, N. P., Schook, L., Bradshaw, M., et al. (1996). Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Pharmacology*, *310*, 209–216.
20. Salvatore, C. A., Tilley, S. L., Latour, A. M., Fletcher, D. S., Koller, B. H., & Jacobson, M. A. (2000). Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 4429–4434.
21. Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, *53*, 527–552.
22. Bowlin, T. L., Borchering, D. R., Edwards, C. K., 3rd, & McWhinney, C. D. (1997). Adenosine A3 receptor agonists inhibit murine macrophage tumor necrosis factor-alpha production in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, *43*, 345–349.
23. Hasko, G., Szabo, C., Nemeth, Z. H., Kvetan, V., Pastores, S. M., & Vizi, E. S. (1996). Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of Immunology*, *157*, 4634–4640.
24. Hasko, G., Kuhel, D. G., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Deitch, E. A., Mabley, J. G., et al. (2000). Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *The FASEB Journal*, *14*, 2065–2074. doi:10.1096/fj.99-0508com14/13/2065.
25. Kreckler, L. M., Gizewski, E., Wan, T. C., & Auchampach, J. A. (2009). Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages through a protein kinase A- and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *331*, 1051–1061. doi:10.1124/jpet.109.157651.
26. Murphree, L. J., Sullivan, G. W., Marshall, M. A., & Linden, J. (2005). Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *The Biochemical Journal*, *391*, 575–580.
27. Khoa, N. D., Montesinos, M. C., Reiss, A. B., Delano, D., Awadallah, N., & Cronstein, B. N. (2001). Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *Journal of Immunology*, *167*, 4026–4032.
28. Khoa, N. D., Postow, M., Danielsson, J., & Cronstein, B. N. (2006). Tumor necrosis factor-alpha prevents desensitization of Galpha-s-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Molecular Pharmacology*, *69*, 1311–1319. doi:10.1124/mol.105.016857.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

# Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker

Benjamin Haas<sup>a,1</sup>, Tommaso Serchi<sup>b,1</sup>, Daniel R. Wagner<sup>c</sup>, Georges Gilson<sup>d</sup>,  
 Sebastien Planchon<sup>b</sup>, Jenny Renaut<sup>b</sup>, Lucien Hoffmann<sup>b</sup>, Torsten Bohn<sup>b,\*</sup>, Yvan Devaux<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, Luxembourg

<sup>b</sup>Department of Environment and Agro-biotechnologies, Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg

<sup>c</sup>Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg

<sup>d</sup>Laboratory of Biochemistry, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 24 March 2011

Accepted 27 June 2011

### Keywords:

2-D-DiGE

Plasma proteins

Myocardial infarction

Heart failure

Biomarkers

Haptoglobin

## ABSTRACT

Prognosis of clinical outcome following myocardial infarction is variable and difficult to predict. We have analyzed the plasma proteome of thirty patients with acute myocardial infarction to search for new prognostic biomarkers. Proteomic analyses of blood samples were performed by 2-D-DiGE after plasma depletion of albumin and immunoglobulins G. New York Heart Association (NYHA) class determined at 1-year follow-up was used to identify patients with heart failure. Principal component analysis and hierarchical clustering of proteomic data revealed that patients could be separated into 3 groups. The 22 differentially expressed proteins involved in this grouping were identified as haptoglobin (Hp) and respective isoforms. The 3 groups of patients had distinct Hp isoforms: patients from group 1 had the  $\alpha 1$ - $\alpha 1$ , patients from group 2 the  $\alpha 2$ - $\alpha 1$ , and patients from group 3 the  $\alpha 2$ - $\alpha 2$  genotype. This classification was also associated with different total plasma levels of Hp. The presence of the  $\alpha 2$  genotype and low plasma levels of Hp was associated with a higher NYHA class and therefore with a detrimental functional outcome after myocardial infarction. A plasma level of Hp below 1.4 g/L predicted the occurrence of heart failure (NYHA 2, 3, 4) at 1-year with 100% sensitivity.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

In developed countries, cardiovascular diseases are a leading cause of morbidity and mortality. They represent a major public health problem, and their prevalence and costs are expected to increase considerably over the next few decades [1]. Myocardial infarction, characterized by the occlusion of a

coronary artery preventing the supply and oxygenation of cardiac cells, is a main cardiovascular event that sets the stage for the development of heart failure. The occurrence of heart failure after myocardial infarction reaches epidemic proportions, affecting 3% of the adult population, with a 5-year mortality rate of 70% [2]. Although the prognosis of myocardial infarction patients has been significantly improved with the

\* Corresponding author at: Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg. Tel.: +352 470 261 480; fax: +352 470 264.

E-mail address: [bohn@lippmann.lu](mailto:bohn@lippmann.lu) (T. Bohn).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order.

use of reperfusion therapies, more than 60% of these patients still develop heart failure during the 6 years following myocardial infarction [2,3]. Early and accurate identification of patients prone to develop heart failure after myocardial infarction would significantly reduce the incidence of heart failure as this disease is potentially preventable. However, the prognostic of heart failure is still difficult to establish and would certainly benefit from the discovery of new biomarkers.

The development of heart failure after myocardial infarction is consecutive to a complex pathophysiological phenomenon called remodeling. This process mainly affects the left ventricle and is dictated by alterations in the regulation of inflammation, turnover of the cardiac extracellular matrix, angiogenesis, and cell survival. These biological processes are mediated and controlled by a plethora of molecules. For instance, during remodeling, the turnover of the extracellular matrix is accelerated by degradation of structural components by members of the matrix metalloproteinase family [4]. We and others reported that matrix metalloproteinase 9 (MMP9) not only contributes to left ventricular remodeling but also constitutes a prognostic indicator of cardiac dysfunction in myocardial infarction patients [5-7].

The complex and multi-facial features of left ventricular remodeling urged researchers to move from the classical "single target analysis" to a more global analysis of large sets of "omics" data to screen, identify and characterize new potential biomarkers. Combining transcriptomic and interactomic data, we previously identified potential sets of new biomarkers of left ventricular dysfunction and heart failure [8-11]. In the present study, we explored the plasma proteome and, using 2-dimensional difference in-gel electrophoresis, we identified haptoglobin (Hp) as a potential predictor of outcome after myocardial infarction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

30 patients enrolled in the Luxembourg acute myocardial infarction registry were included in this study. Patients were of Caucasian origin, with no diabetes (fasting blood sugar level <126 mg/dL) or prior myocardial infarction. Clinical characteristics are shown in Table 1. Diagnosis of acute myocardial infarction was obtained by the presence of chest pain <12 h, positive cardiac enzymes and significant ST-segment elevation. All patients were treated with primary percutaneous coronary intervention. Left ventricular ejection fraction (EF) determined at 4-months and 1-year follow-up by echocardiography was used to evaluate left ventricular dysfunction. New York Heart Association (NYHA) class was used to evaluate heart failure, class 1 meaning no symptoms, class 2 symptoms with moderate exercise, class 3 symptoms with mild exercise and class 4 symptoms at rest. All patients signed a written informed consent and the protocol was approved by the local ethical committee.

**Table 1 – Clinical characteristics of myocardial infarction patients.**

Age, y (mean±SD)	54	10
Male, n (%)	30	100%
Body mass index (mean±SD)	26	4
Serum markers (mean±SD)		
CPK (units/L)	2412	1642
TnT (ng/mL)	6.0	4.3
hsCRP (ng/mL)	14.8	14.8
Cardiovascular history, n (%)		
Prior myocardial infarction	0	0%
CABG	1	3%
PTCA	29	97%
Diabetes	0	0%
Hypertension	8	27%
Hypercholesterolemia	7	23%
Tobacco	18	60%
Medications, n (%)		
Beta-blockers	29	87%
Calcium antagonists	0	0%
Nitrates	3	10%
ACE inhibitors	20	67%
Statins	26	87%
Angiotensin inhibitors	0	0%

All myocardial infarction patients had successful mechanical reperfusion and stenting of the infarct artery within 12 h of chest pain onset. All patients received aspirin, clopidogrel, heparin and abciximab in the presence of large thrombus burden.

ACE: angiotensin converting enzyme; CABG: coronary artery bypass grafting; CPK: creatine phosphokinase; CRP: C-reactive protein; EF: ejection fraction; and PTCA: percutaneous transluminal coronary angioplasty.

### 2.2. Plasma collection and albumin/IgG depletion

Plasma samples were collected at presentation using the BD™ P100 blood collection system (Beckton Dickinson, Franklin Lake, USA). These tubes were coated with spray-dried anticoagulant (EDTA) and protein stabilizers, allowing the mechanical separation of plasma from blood cells after centrifugation at 2500×g for 20 min. Collected plasma was depleted of human serum albumin and immunoglobulin G using the HSA/IgG removal kit (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). This depletion allowed improving the resolution of 2D gels (Figure S1, online supplement). Protein concentration of depleted plasma was assessed with a BCA protein assay kit (Pierce Technology, Rockford, USA) following the manufacturer's instructions. Samples were stored at -80 °C until analysis.

### 2.3. Two-dimensional difference in-gel electrophoresis (2D-DiGE)

Unless stated otherwise, all materials were from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Albumin and IgG depleted plasma samples were separated by 2D-DiGE following an adapted protocol as described by Lasserre et al. [12]. 30 µg of plasma proteins was used for each sample. Prior to analysis, the pH of plasma samples was adjusted to 8.5 with 3 M Tris. Plasma samples were then randomly labeled with either Cy3 or Cy5 dye. A pool of equal volumes of plasma samples from each subject was generated and used as an internal standard to

correct for potential uneven loading and electrophoresis conditions. For each gel, 30  $\mu\text{g}$  of proteins from this pool was labeled with Cy2 dye. Labeling was achieved by the minimal labeling process with 240 pmol of dye for 30 min on ice and in the dark. The labeling reaction was stopped with 1  $\mu\text{L}$  of 10 mM lysine and incubation was continued for 10 min on ice in the dark. Then, one Cy3-labeled and one Cy5-labeled experimental sample were combined with the Cy2-labeled internal standard, and the volume was adjusted to 450  $\mu\text{L}$  by addition of sample buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 0.5% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) and traces of bromophenol blue]. 9  $\mu\text{L}$  of Bio-Lyte pH 3–10 ampholyte buffer (Bio-Rad, Nazareth-Eke, Belgium) and 2.7  $\mu\text{L}$  of destreak reagent were then added to each tube. Samples were loaded onto an Immobiline DryStrip (24 cm, pH 3–10 non-linear, BioRad) and incubated overnight at room temperature to achieve optimal passive rehydration of the strip and loading of the samples. Proteins were then subjected to isoelectric focusing carried out on an IPGphor III at 20  $^{\circ}\text{C}$ . Mineral oil was added on the strips to prevent evaporation. The voltage was increased stepwise from 30 to 10,000 V during the first 21 h and then stabilized at 10,000 V for 8 h (about 120 kWh of total current applied to each strip). Following isoelectric focusing, strips were equilibrated for 15 min in equilibration buffer (2Dgel DALT, Gel Company, Tübingen, Germany) containing urea and 2% DTT, and then for another 15 min in the same buffer but containing 1% iodoacetamide instead of DTT. After equilibration, strips were loaded on precast gels (2Dgel DALT NF 12.5%, Gel Company) for second dimension separation using an Ettan DALT II (GE Healthcare) system with 0.5 W/gel for 2 h and then 2.5 W/gel for 14 h at 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Gels were scanned using a Typhoon 9400 (GE Healthcare) scanner with a spatial resolution of 100  $\mu\text{m}$  and analyzed by the DeCyder 2D Differential Analysis v.7.0 software. Protein images were produced by excitation at 488 nm, 532 nm, and 633 nm (Cy2, Cy3 and Cy5, respectively) and emission at 520 nm, 610 nm and 670 nm (Cy2, Cy3 and Cy5, respectively). Produced maps were analyzed by multivariate tests and grouped on the basis of their common features. Spots responsible for the classification of patients were selected as proteins of interest. Selected spots were located on a gel and a “picking list” was generated. Spot picking, digestion and loading onto MALDI disposable target plates (MALDI-Tof-Tof 4800, Applied Biosystems, Foster City, CA) was automatically performed using the Ettan Spot Handling Workstation as described [13]. Peptide mass fingerprint and MS/MS analyses were carried out using the Applied Biosystems MALDI-Tof-Tof 4800 Proteomics Analyser. Calibration was carried out with the peptide mass calibration kit 4700 (Applied Biosystems). Proteins were identified by searching against the SWISSPROT database (version 20100924 with 519538 sequences) with “*Homo sapiens*” as taxonomy, using GPS Explorer Software v3.6 (Applied Biosystems) including MASCOT (Matrix Science, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), London, UK). All searches were carried out allowing for a mass window of 150 ppm for the precursor mass and 0.75 Da for fragment ion masses. The search parameters allowed for carboxyamidomethylation of cysteine as fixed modification. Oxidation of methionine and oxidation of tryptophan (single oxidation, double oxidation and kynurenin) were set as variable modifications. Proteins

with probability-based MOWSE scores ( $P < 0.01$ ) were considered to be positively identified.

## 2.4. Biochemical assays

Creatine phosphokinase (CPK) activity was measured with a Roche IFCC recommended method on a Cobas c501 instrument (Roche, Prohac, Luxembourg). Troponin T (TnT) was measured with a 4th generation assay from Roche that was performed on a Cobas e601 equipment (Roche), 0.01  $\mu\text{g/L}$  being the lower detection limit and 0.03  $\mu\text{g/L}$  being the TnT concentration that is reproducibly measured with a coefficient of variation below 10%. Hp was measured with the Tina-quant v2 kit from Roche on a Cobas c501 equipment (Roche). This kit recognizes all three phenotypes of Hp ( $\alpha 1\text{-}\alpha 1$ ,  $\alpha 1\text{-}\alpha 2$ ,  $\alpha 2\text{-}\alpha 2$ ) and has a lower detection limit of 0.1 g/L. Normal values range between 0.3 and 2 g/L. MMP9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay from R&D Systems (Oxon, UK). MMP9 assay (cat # DMP900) detects both active and pro-MMP9 with a sensitivity of 0.156 ng/mL. TIMP1 assay (cat # DTM100) has a sensitivity of 0.08 ng/mL.

## 2.5. Statistical analysis

All data were subjected to the Shapiro–Wilk test for normality between performing comparisons. Comparisons between two groups were performed by t-tests or Mann–Whitney tests. One-way ANOVA was used for multiple group comparisons. Correlations between plasma markers were assessed with the Pearson test. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) was used to assess the prognostic value of single biomarkers. All tests were two-sided and a P value  $< 0.05$  was considered as significant. Statistical analyses were performed with the SigmaPlot v11.0 software.

Investigation of clinical factors linked to left ventricular dysfunction was performed using a linear mixed model with ejection fraction as the observed (dependent) variable, and anthropometric data and clinical parameters as the independent variables (fixed or covariate), followed by Bonferroni post-hoc tests if appropriate.

For proteomic analysis, separated spots were subjected to principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering to highlight protein patterns and to group samples based on relevant biological patterns. Analyses were conducted blindly of any knowledge of patient characteristics. Prior to analysis, the protein set was filtered for the presence of the protein spot in at least 50% of the spot maps and for an ANOVA with a P value  $\leq 0.05$ . All proteomic analyses were carried out using the DeCyder 2D Differential Analysis program v.7.0. (GE Healthcare).

## 3. Results

### 3.1. Clinical data and patient follow-up

All 30 patients enrolled in this study were 1-year survivors after ST-elevation acute myocardial infarction treated by

mechanical reperfusion. See Table 1 for clinical characteristics and medications. Diagnosis was based on ECG changes and elevation of CPK and TnT. None of them had a history of myocardial infarction, stroke or diabetes. One fourth of the population had hypertension and hypercholesterolemia and 60% were smokers.

The mean EF measured at 4-months follow-up with echocardiography was  $51 \pm 12\%$ , varying between 40 and 70% (Table 1). This EF did not significantly change 1 year after myocardial infarction ( $51 \pm 4\%$ ). Following linear mixed model analysis, among the factors investigated, only smoking habit was significantly associated with the EF measured at 4-months follow-up ( $P=0.014$ ). Other parameters, including age, body mass index, CPK, and CRP (C-reactive protein) had no significant correlation with EF. At 4-months, 17 patients were in NYHA class 1, 5 patients in HYNAL class 2 and 1 patient in NYHA class 3. The NYHA class did not change between 4-months and 1 year follow-up.

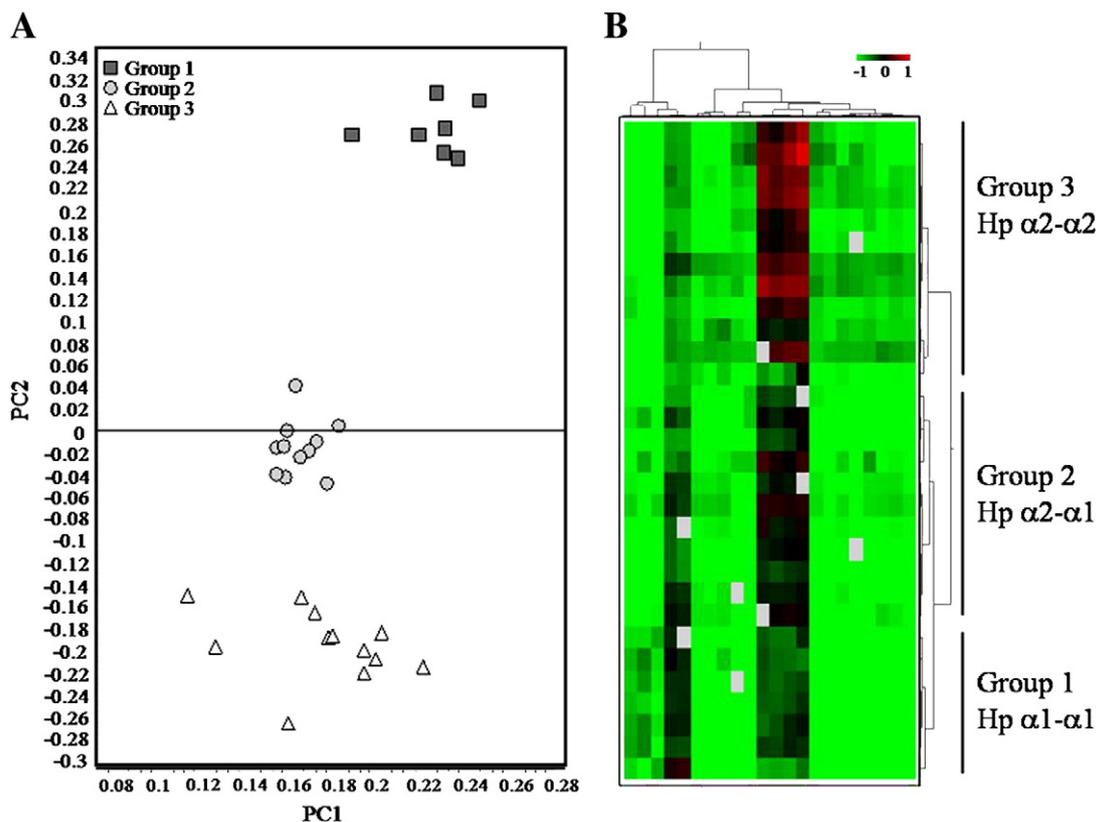
### 3.2. Proteomic investigation

After separation, gels were acquired with a Typhoon 9400 instrument (GE Healthcare) and spot detection (mean number  $\pm$ SD of spot:  $2067 \pm 213$ ) and matching were performed using the DeCyder 2D Differential Analysis program v.7.0. As no grouping of the patients was conducted prior to proteomic analyses, results were analyzed in a blinded manner using

multivariate tests (PCA and hierarchical clustering). PCA clearly showed that samples could be divided into 3 groups (Fig. 1A). The cumulative variance of 90% was reached with component 2. Group 2 and group 3 were relatively close to each other, while group 1 was slightly more separated from the other two groups. The same classification was obtained following hierarchical clustering, where the 3 groups formed single clusters, with groups 1 and 2 being closer to each other than group 3 (Fig. 1B). The analyses revealed that 22 differentially expressed proteins were involved in this classification (Fig. 1B). The spots corresponding to these 22 proteins were used to create a picking list. Mass spectrometry identified all of these spots as Hp and respective isoforms (Table 2). Due to the high homology of Hp isoforms, it was difficult to distinguish them based on mass spectrometry alone. For this reason, identification of each patient's Hp isoform was further derived on the basis of the molecular weight of the isoforms: 9 kDa for Hp  $\alpha 1$ , 17 kDa for Hp  $\alpha 2$  and 40 kDa for Hp  $\beta$  [14]. Attribution of the picked spots to their respective isoforms is shown in Fig. 2.

### 3.3. Haptoglobin isoforms and Hp plasma levels

The grouping of patients by PCA and hierarchical clustering was clearly associated with Hp isoforms: patients from group 1 had the  $\alpha 1-\alpha 1$  genotype, patients from group 2 the  $\alpha 2-\alpha 1$  genotype and patients from group 3 the  $\alpha 2-\alpha 2$  genotype. This



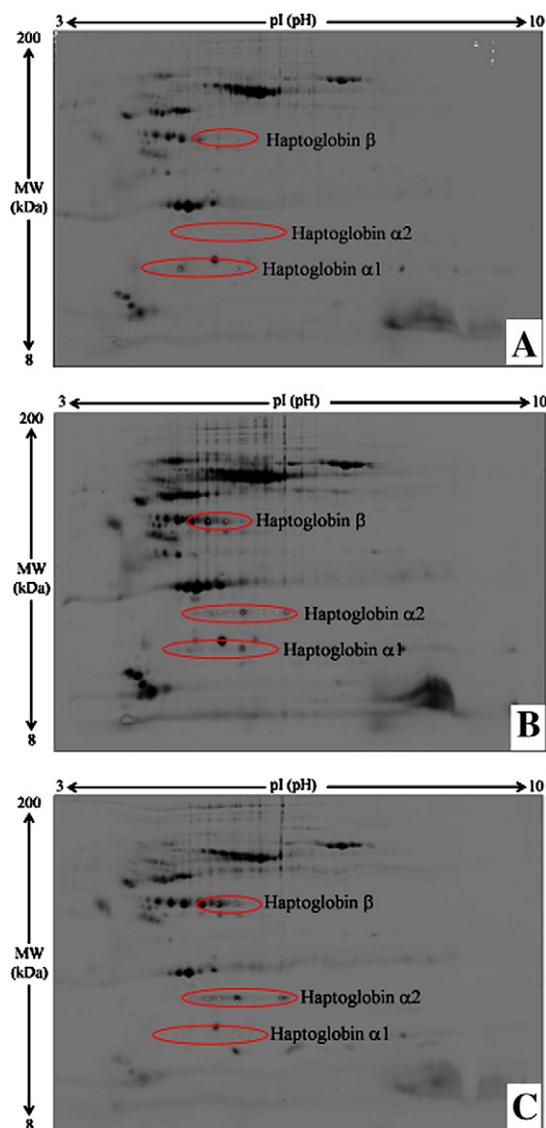
**Fig. 1 – Grouping of acute MI patients.** Plasma samples from the 30 patients of the test cohort were processed by 2D-DiGE. Principal component analysis (A) and hierarchical clustering (B) identified 3 groups of patients. In PCA, the cumulative variance of 90% was reached with component 2.

Table 2 – List of 22 proteins responsible for the classification of patients into 3 distinct groups.

Spot no.	Gene name	Protein name	Haptoglobin isoform	Acc no.	Theor. Mr	Theor. pI	MOWSE score	Identification P-value	Queries matched	Seq cov %	Av ratio G2 vs G1	t-Test G2 vs G1	Av ratio G3 vs G1	t-Test G3 vs G1	Av ratio G3 vs G2	t-Test G3 vs G2
1005	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	465	6.40E-43	30	47%	-1.91	8.14E-03	-3.43	1.63E-06	-1.8	3.10E-03
1006	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	448	3.20E-41	27	35%	-1.61	0.0176	-2.83	3.60E-06	-1.76	5.95E-03
1035	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	353	1.00E-31	32	33%	1.87	8.39E-04	4.82	3.04E-05	2.57	1.63E-03
1036	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	392	1.30E-35	28	42%	1.86	1.41E-03	4.61	1.76E-04	2.47	3.14E-03
1038	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	405	6.40E-37	27	40%	2.19	1.50E-03	4.66	3.77E-04	2.12	0.0307
1623	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	245	6.40E-21	15	23%	2.13	0.0133	3.65	1.52E-04	1.71	0.0276
1626	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	359	2.60E-32	18	27%	8.27	4.68E-07	13.25	7.54E-13	1.6	4.86E-03
1627	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	155	6.40E-12	15	25%	2.57	9.36E-04	6.72	1.89E-08	2.61	1.00E-05
1631	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	103	1.00E-06	10	23%	2.2	8.59E-03	4.51	7.60E-06	2.05	1.05E-03
1632	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	139	2.60E-10	16	25%	20.04	1.22E-09	32.81	1.75E-12	1.64	7.47E-03
1633	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	238	3.20E-20	15	23%	5.72	2.36E-08	14.27	3.12E-11	2.5	9.86E-06
1637	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	388	3.20E-35	17	27%	8.79	3.29E-08	14.84	7.40E-11	1.69	2.25E-03
1639	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	504	8.10E-47	18	23%	13.56	5.83E-10	25.86	2.62E-13	1.91	1.04E-03
1641	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	266	5.10E-23	15	23%	2.24	2.24E-03	2.79	1.17E-03	1.24	0.491
1642	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	328	3.20E-29	17	27%	3.94	1.89E-04	5.96	9.31E-06	1.51	0.0535
1651	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	308	3.20E-27	16	33%	4.51	3.49E-06	5.28	2.98E-07	1.17	0.43
1656	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	292	1.30E-25	16	23%	5.4	2.24E-06	8.47	1.50E-08	1.57	0.0238
1661	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 2	P00738	45861	6.13	254	8.10E-22	14	23%	3.5	9.73E-06	7.22	3.10E-08	2.06	4.29E-04
1877	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 1	P00738	45861	6.13	270	2.00E-23	17	28%	-2.84	2.96E-03	-14	3.78E-08	-4.93	8.00E-06
1886	HPTR_HUMAN	Haptoglobin related protein	Hp $\alpha$ 1	P00739	39518	6.63	136	5.10E-10	9	21%	-1.76	0.0102	-5.91	8.24E-10	-3.36	4.11E-07
1890	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\alpha$ 1	P00738	45861	6.13	72	0.0012	9	14%	-2.19	2.85E-04	-3.33	8.15E-05	-1.52	0.037
2507	HPT_HUMAN	Haptoglobin	Hp $\beta$	P00738	45861	6.13	278	3.20E-24	18	27%	2.08	6.96E-04	3.82	9.70E-04	1.84	0.0665

Each protein is reported with the gene name, the protein name, the attribution to the specific Hp isoform, Swiss-prot accession number, the theoretical mass and isoelectric point, the MOWSE score of the identification, the P-value of the identification, number of queries matched with mass finger print, percentage of sequence coverage and the fold change for each group pair, with the respective P-value following t-tests.

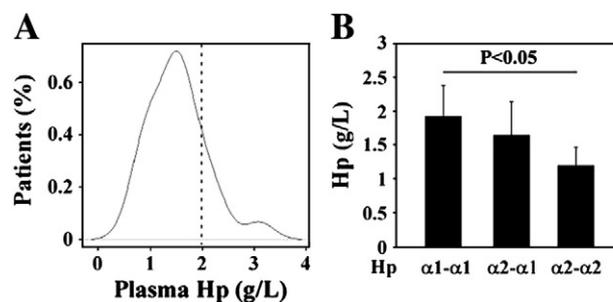
Q1



**Fig. 2** – Pictures of 2D-DiGE gels from plasma samples of acute MI patients. (A) Representative gel of a patient of group 1 showing the presence of  $\alpha 1$  isoforms. (B) Representative gel of a patient of group 2 showing the presence of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  isoforms. (C) Representative gel of a patient of group 3 showing the presence of  $\alpha 2$  isoforms.

grouping was however not statistically significantly associated with infarct severity and myocardial damage (as assessed by CPK and TnT levels); left ventricular function (as assessed by ejection fraction); markers of extracellular matrix turnover (MMP9, TIMP1); nor with markers of inflammation (WBC counts and CRP levels).

We investigated whether Hp plasma levels were different between the 3 groups. Mean level of Hp was 1.52 g/L. 4 patients had a Hp level above the upper limit of normal (2 g/L, Fig. 3A). Patients from the 3 groups determined by PCA and hierarchical clustering had distinct levels of Hp, group 1 having the highest level and group 3 the lowest level (Fig. 3B).



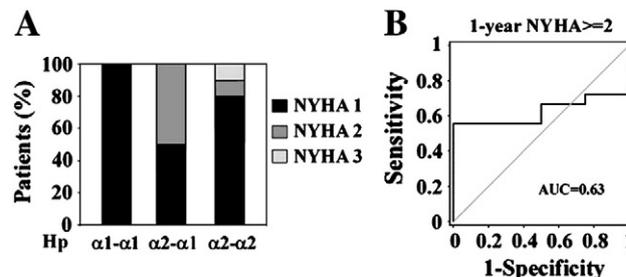
**Fig. 3** – Plasma Hp levels in 30 acute MI patients. (A) Frequency plot. The dotted line indicates the 2 g/L threshold for abnormally high Hb values. (B) The 3 groups of patients of the test cohort showed different Hp plasma levels. Means  $\pm$  95% confidence intervals are shown.

#### 3.4. Association between Hp and clinical outcome

Outcome after myocardial infarction was evaluated by the NYHA class. We observed a distinct distribution of NYHA classes among the 3 groups: all patients from group 1 were in NYHA class 1, 50% of patients of group 2 were in NYHA class 2, and 10% of patients from group 3 were in NYHA classes 2 and 3. No patients were in NYHA class 4 (Fig. 4A). ROC curve analysis revealed an overall modest ability (AUC=0.63) of Hp to predict the occurrence of heart failure (NYHA score >2). Interestingly, a Hp level <1.4 g/L predicted heart failure with a sensitivity of 100% (Fig. 4B). Therefore, both low levels of Hp and presence of the  $\alpha 2$  isoform appear to be associated with a worse functional outcome after myocardial infarction.

## 4. Discussion

In this study, we tested the hypothesis that the plasma proteome is a source of prognostic biomarkers after acute myocardial infarction. The main finding of this proteomic



**Fig. 4** – Association between Hp and NYHA score. (A) Distribution of patients from the 3 groups in NYHA classes. All patients of group 1 were in NYHA class 1, half of patients of group 2 were in NYHA class 2, and 10% of patients from group 3 were in NYHA classes 2 and 3. No patient was in NYHA class 4. (B) Receiver operating characteristic curve and area under the ROC curve (AUC) showing that Hp is an overall modest predictor of 1-year NYHA class.

investigation is the identification of Hp as a potential predictor of outcome following acute myocardial infarction in humans.

Major advances in proteomic technologies achieved during the last few decades attracted researchers from a broad range of biomedical fields including the cardiovascular field [15]. The usefulness of studying the plasma proteome to identify biomarkers and therapeutic targets of cardiac dysfunction has been reported [16–18]. Proteomic analysis of plasma proteins allows the study of primary effectors of cellular function during pathogenesis [16–18]. For instance, proteomic analyses demonstrated that several proteins were present at high concentration in oxidized form in the plasma of heart failure patients [19]. However, the number of proteomic studies dedicated to biomarker discovery in heart failure is comparatively still limited.

The acute phase protein Hp has been described in all mammalian species. Human Hp is composed of four subunits (2  $\alpha$  subunits and 2  $\beta$  subunits) linked by disulfide bridges [14]. In humans, but not in all other species such as in mice, there exists a functional polymorphism in the gene encoding for the  $\alpha$  subunits, which can generate two possible isoforms:  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  [20]. The two alleles have different molecular weights (9 kDa for  $\alpha 1$  and 17 kDa for  $\alpha 2$ ), and different binding affinity for free hemoglobin ( $\alpha 1$  higher than  $\alpha 2$ ) [21]. In humans, 3 genotypes are observed:  $\alpha 1$ - $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ , with an expected distribution in the European population of approx. 15%, 48% and 37%, respectively [22,23]. In our cohort, the distribution was as follows: 23%, 37% and 40% for  $\alpha 1$ - $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ - $\alpha 2$  genotypes, respectively. Hp expression is known to be modulated during chronic and acute inflammation [21]. Thus, Hp has been associated with several diseases involving an inflammatory component, especially type II diabetes [24]. Accordingly, there is a strong relationship between Hp genotype and the outcome of patients with pre-existing diabetes [25]. Furthermore, in patients with type II diabetes, the risk of developing cardiovascular disease is dependent on the Hp genotype, and is highest for Hp  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ , moderately high for Hp  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  and lowest for Hp  $\alpha 1$ - $\alpha 1$  [26]. In diabetic mice, the Hp isoform was associated with cardiac remodeling and mortality after myocardial infarction [27]. This observation in mice is consistent with the present study in humans. In addition, our study suggests that the association between Hp isoforms and outcome after myocardial infarction could also be valid in non-diabetic patients.

Analysis of proteomic results by PCA and hierarchical clustering, followed by mass spectrometry identification of candidate proteins, revealed that the 30 patients enrolled in this study could be distinguished through their Hp genotype. We observed that the distribution of Hp genotype was not associated with infarct severity, expression of markers of extracellular matrix turnover, or mortality. However, we found a correlation between Hp genotype and NYHA class at 1-year follow-up. In addition, our results suggest that not only the type of Hp isoform but also total Hp plasma levels correlate with the occurrence of heart failure after myocardial infarction. The ability of Hp to scavenge free hemoglobin is not the same for the two isoforms, with Hp- $\alpha 1$  being more efficient than Hp- $\alpha 2$  [21]. Thus, the expression of the genotype  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ , together with the reduced levels of Hp detected in patients belonging to group 3, as highlighted by the PCA analysis, could result in increased

cardiac tissue damage during myocardial infarction and would thus be associated with a worse outcome.

Haptoglobin is an independent prognostic marker in several diseases. A large clinical study by Holme et al. has shown that elevated Hp plasma levels can be used to predict the risk of cardiac disease [28]. This observation appears contradictory to the results reported in our study, where low levels of Hp measured at the time of presentation in acute myocardial infarction patients predicted the development of heart failure as attested by NYHA class. However, the study by Holme did not specifically address the prognostic value of Hp in patients with acute myocardial infarction, but rather considered Hp as a risk factor for developing cardiovascular diseases in a population of healthy volunteers. Our study suggests for the first time that that Hp genotype and levels at the moment of the myocardial infarction may be prognostic biomarkers of heart failure following acute myocardial infarction. It can be speculated from these data that Hp is detrimental when elevated in healthy volunteers but may be beneficial after acute myocardial infarction.

In addition to its potential value as a biomarker, Hp can be assumed not to merely be a passive bystander of disease. This may be related to its main function, which is the binding and scavenging of free hemoglobin. Hemoglobin binds and transports oxygen to the tissues. However, hemoglobin is highly toxic when present in a free state, unbound within the erythrocytes, e.g. in the blood plasma [29]. Owing to its lipophilic nature, hemoglobin has the potential to disrupt cell membrane bilayers and, as iron is present in its prosthetic group, can lead to the formation of reactive oxygen species and to tissue damage [30]. The ability of Hp to bind free hemoglobin and to form a complex that is rapidly captured by monocytes through the CD163 receptor and degraded in the spleen and liver, thus contributes to reduce the potential of free hemoglobin to trigger oxidative tissue damage [31]. In addition, Hp modulates the inflammatory response [21] and may therefore contribute to the inflammatory component of left ventricular remodeling. Another potential functional role of Hp in left ventricular remodeling may be its ability to interact with MMP9 and MMP2 [32], which are of primary importance for matrix degradation and tissue remodeling.

This proof-of-concept study has some limitations, the main coming from the low number of patients enrolled. Also, the NYHA class may not be the best indicator of heart failure since it may be subject to bias from both patient and clinician. More objective indicators of left ventricular dysfunction will have to be considered in future validation studies. These include for instance the change of left ventricular volumes between discharge and follow-up. Furthermore, assessment of cardiac function with magnetic resonance imaging technique will certainly be of added informative value compared with the traditional echocardiography technique used in the present study.

## 5. Conclusions

In conclusion, proteomic analysis of plasma proteins identified haptoglobin as potential prognostic biomarker after acute

myocardial infarction. This observation has to be studied in larger populations for further validation. If confirmed, this biomarker, which can easily be measured, may become clinically important for the prognosis and care of infarction subjects.

## Acknowledgments

We thank Malou Gloesener, Loredana Jacobs, Céline Jeanty, Christelle Nicolas, Bernadette Leners and Laurent Quennery for expert technical assistance. The help of Celine Leclercq for proteomic analyses is acknowledged. This study was funded by the National Research Fund of Luxembourg (grant # C08/BM/08). B.H. was recipient of a fellowship from the National Research Fund of Luxemburg (fellowship # TR-PhD BFR 08-082).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jprot.2011.06.028](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.028).

## REFERENCES

- Heidenreich PA, Trogon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, et al. Circulation 2011;122:933-44.
- Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, et al. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29:859-70.
- Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC, McAlister FA. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:13-20.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-342.
- Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006;12:514-9.
- Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2006;12:66-72.
- Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J* 2007;28:711-8.
- Azuaje F, Devaux Y, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: a proof-of-concept investigation. *J Biomed Inform* 2010;43:812-9.
- Azuaje F, Devaux Y, Wagner DR. Coordinated modular functionality and prognostic potential of a heart failure biomarker-driven interaction network. *BMC Syst Biol* 2010;4:60.
- Azuaje F, Devaux Y, Wagner DR. Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction. *PLoS One* 2010;5:e9661.
- Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics* 2010;10:329-37.
- Lasserre JP, Fack F, Revets D, Planchon S, Renaut J, Hoffmann L, et al. Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. *J Proteome Res* 2009;8:5485-96.
- Renaut J, Hausman JF, Bassett C, Artlip T, Cauchie HM, Witters E, et al. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach [*Prunus persica* L. Batsch]. *Tree Genet Genomes* 2008;4:589-600.
- Tseng CF, Huang HY, Yang YT, Mao SJ. Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 2004;33:265-73.
- Van Eyk JE. Overview: the maturing of proteomics in cardiovascular research. *Circ Res* 2011;108:490-8.
- Edwards AV, White MY, Cordwell SJ. The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1824-37.
- Lathrop JT, Anderson NL, Anderson NG, Hammond DJ. Therapeutic potential of the plasma proteome. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:250-7.
- Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, et al. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* 2004;4:244-56.
- Banfi C, Brioschi M, Barcella S, Veglia F, Biglioli P, Tremoli E, et al. Oxidized proteins in plasma of patients with heart failure: role in endothelial damage. *Eur J Heart Fail* 2008;10:244-51.
- Smithies O, Walker NF. Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* 1955;176:1265-6.
- Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:735-42.
- Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A, et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002;48:1377-82.
- Delanghe J, Langlois M, Duprez D, De Buyzere M, Clement D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999;145:287-92.
- Quaye IK, Ababio G, Amoah AG. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. *J Atheroscler Thromb* 2006;13:90-4.
- Costacou T, Ferrell RE, Orchard TJ. Haptoglobin genotype: a determinant of cardiovascular complication risk in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:1702-6.
- Levy AP. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol* 2003;40(Suppl 2):S330-3.
- Asaf R, Blum S, Roguin A, Kalet-Litman S, Kheir J, Frisch A, et al. Haptoglobin genotype is a determinant of survival and cardiac remodeling after myocardial infarction in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:29.
- Holme I, Aastveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. Haptoglobin and risk of myocardial infarction, stroke, and congestive heart failure in 342,125 men and women in the Apolipoprotein MOrtality RiSk study [AMORIS]. *Ann Med* 2009;41:522-32.
- Alayash AI. Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nat Rev* 2004;3:152-9.
- Alayash AI. Redox biology of blood. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:941-3.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409:198-201.
- de Kleijn DPV, Smeets MB, Kemmeren PPW, Lim SK, van Middelaar BJ, Velema E, et al. Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J* 2002;16:1123-5.



## **Abstract**

Heart failure following myocardial infarction is a complex pathology that occurs as a result of left ventricular remodeling. Left ventricular remodeling is mediated in part by extracellular cardiac matrix turnover and inflammation. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and innate immune receptor Toll-like 4 (TLR4) are key mediators of left ventricular remodeling. Cardioprotective and anti-inflammatory nucleoside adenosine acts on left ventricular remodeling through still poorly characterized mechanisms. We hypothesized that adenosine regulates left ventricular remodeling through modulation of MMP9 and TLR4 pathways in macrophages. Using human primary macrophages, we showed that adenosine increases MMP9 production through the A3 receptor. In a second set of experiments, we observed that adenosine dampens inflammation through decreased cell-surface expression of TLR4. This effect, which inhibits pro-inflammatory cytokines production, is induced by adenosine A2A receptor. All together, these results contribute to a better understanding of the mechanisms underlying left ventricular remodeling and suggest a potential therapeutic use of adenosine. Our data suggest testing a therapeutic strategy with different adenosine analogs to prevent or limit left ventricular remodeling.

Prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction is clinically relevant and would benefit from the discovery of new biomarkers. Proteomic analysis of plasma samples from a test cohort of 30 myocardial infarction patients identified haptoglobin as a potential prognostic biomarker. Human haptoglobin has 3 distinct isoforms:  $\alpha 1$ - $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ . Our results suggest that the presence of  $\alpha 2$  isoform, together with low plasma levels of total haptoglobin, is associated with the development of heart failure. This proof-of-concept study suggested that haptoglobin could be added to the panel of existing biomarkers of heart failure.

**Keywords:** adenosine, macrophages, myocardial infarction, heart failure, inflammation, left ventricular remodeling, MMP9, TLR4, biomarker, haptoglobin, proteomic.

## **Résumé**

L'insuffisance cardiaque consécutive à un infarctus du myocarde est une pathologie complexe qui apparaît suite au remodelage du ventricule gauche. Le renouvellement et la dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque et l'inflammation sont impliqués dans la mise en place du remodelage post infarctus du myocarde. La métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) et le récepteur de l'immunité innée Toll-like 4 (TLR4) sont des médiateurs clés du remodelage ventriculaire. L'adénosine est un nucléoside cardioprotecteur et anti-inflammatoire dont les effets sur le remodelage sont encore mal caractérisés. Nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pourrait moduler les voies de la MMP9 et du TLR4 dans les macrophages, et ainsi réguler le remodelage ventriculaire. Nos résultats montrent que l'activation du récepteur A3 à l'adénosine augmente la production de MMP9 par les macrophages primaires humains. D'autre part, nous avons observé que l'adénosine réduit l'inflammation par une diminution de l'expression de surface du TLR4. Cet effet se traduit par une inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et est induit par l'activation du récepteur A2A. Ces résultats ont permis de caractériser certains mécanismes par lesquels l'adénosine agit sur le remodelage ventriculaire. Ils suggèrent de tester, dans un modèle animal, l'administration d'analogues de l'adénosine pour prévenir ou limiter le remodelage.

La capacité à prédire la survenue du remodelage ventriculaire après un infarctus du myocarde est importante d'un point de vue clinique et bénéficierait de la découverte de nouveaux biomarqueurs. L'analyse par protéomique du plasma de 30 patients d'une cohorte test ayant développé un infarctus du myocarde a permis d'identifier l'haptoglobine comme biomarqueur pronostique potentiel. L'haptoglobine humaine possède 3 isoformes :  $\alpha 1$ - $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ . Nos résultats suggèrent que la présence du phénotype  $\alpha 2$  et d'un taux plasmatique d'haptoglobine faible sont associés à l'apparition d'une insuffisance cardiaque. Cette étude preuve-du-concept suggère que l'haptoglobine pourrait être ajoutée à la liste existante des biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque.

**Mots-clés RAMEAU:** Myocarde – Infarctus, Insuffisance cardiaque, Adénosine, Haptoglobine, Marqueurs biologiques

**Mots-clés:** macrophages, inflammation, remodelage ventriculaire gauche, MMP9, TLR4, biomarqueur, protéomique.