



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par Jérémie LEMARIÉ

Modulation de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde

Soutenue le 22 janvier 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Laurent ARGAUD	PU-PH, HDR, UMR INSERM U1060 – CarMeN, Lyon
	Pr Frédéric PÈNE	PU-PH, HDR, Université PARIS 5 (René Descartes), Paris
Examineur :	Pr Edoardo CAMENZIND	PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse :	Pr Sébastien GIBOT	PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy

Equipe TREM – U1116
Faculté de Médecine de Nancy – 9, avenue de la forêt de Haye – BP184
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Professeurs Laurent Argaud et Frédéric Pène pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'au Professeur Edoardo Camenzind pour avoir accepté d'en être examinateur.

Merci à toute l'équipe d'Inotrem, notamment Amir, Marc, Lucie et Kevin, pour l'ambiance chaleureuse que vous y faites régner.

Merci à tous les membres du PARCC pour m'avoir si bien accueilli pendant une année, et de continuer à m'y accueillir si chaleureusement.

Je remercie vivement le Professeur Hafid Ait-Oufella pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa motivation, son énergie communicative. Je suis très honoré de pouvoir continuer à travailler à tes côtés.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la détermination sans faille de mon directeur de thèse, Professeur Sébastien Gibot. Sébastien, j'espère que tu trouveras dans ces quelques lignes le reflet de l'estime et de la reconnaissance que j'ai pour toi. Au cours de ces trois dernières années, et même depuis bien plus longtemps, tu as su m'aider à prendre les bonnes décisions, tu as su guider mes choix sans me les imposer, discrètement mais toujours au bon moment. J'espère pouvoir longtemps continuer à être déconcerté face à l'étendue de ton savoir.

Merci Camille pour ce que tu m'as offert et m'offres encore. Ton amour, ta confiance, notre famille... Merci de m'avoir soutenu dans ces projets accaparants.

Table des matières

Introduction	4
1. Le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1	5
1.1 Toll-Like Receptors.....	5
1.2 Structure et fonction de TREM-1	6
1.3 LR12, un inhibiteur de TREM-1	7
2. Infarctus du myocarde et inflammation.....	9
2.1 Généralités.....	9
2.2 Lésions de reperfusion myocardique.....	10
2.2.1 Définition.....	10
2.2.2 Acteurs physiopathologiques.....	10
2.3 Remodelage ventriculaire.....	11
2.3.1 Définition.....	11
2.3.2 Remodelage de la matrice extra-cellulaire	14
2.3.3 Rôle des systèmes neurohormonaux	16
2.4 Réponse immunitaire.....	18
2.4.1 Initiation de la réponse immunitaire.....	18
2.4.2 Les effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire post-infarctus.....	20
2.4.3 Résolution de la réponse inflammatoire	28
3. Justification de l'étude de TREM-1 au cours de l'infarctus.....	29
3.1 Échecs des thérapeutiques anti-inflammatoires.....	29
3.2 Similitudes entre l'infarctus du myocarde et le choc septique	31
Publications.....	33
1. TREM-1 mediates inflammatory injury and cardiac remodeling following myocardial infarction.	34
2. Pharmacological inhibition of TREM-1 limits reperfusion injury in a porcine model of myocardial infarction.....	65
Conclusion.....	81
Perspectives.....	83
Références	85

Introduction

1. LE TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS-1

1.1 TOLL-LIKE RECEPTORS

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Elle implique un certain nombre d'acteurs cellulaires tels que les neutrophiles ou les monocytes/macrophages. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs cellulaires nommés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) chargés de la reconnaissance de motifs microbiens conservés, connus sous le nom de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*).¹ Ce sont par exemple le LPS (*LipoPolySaccharide*), le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque. Les interactions entre PAMPs et PRRs vont enclencher des cascades de signaux intracellulaires dans les cellules immunitaires, mais également dans les cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que le système neuroendocrinien, initiant ainsi la réponse inflammatoire à l'infection.

Parmi les PRRs, les TLRs (*Toll-Like Receptors*) occupent une place centrale.² La protéine Toll, qui signifie « superbe » ou « merveilleux » en allemand, a été découverte en 1985 lors de l'étude du développement embryonnaire de la drosophile.³ Son implication dans la réponse immunitaire aux bactéries et aux champignons, toujours chez la drosophile, a été découverte une décennie plus tard.⁴ En 1997, une protéine transmembranaire partageant de nombreuses homologies de séquence a été identifiée chez l'Homme ; la création d'un mutant constitutionnellement actif de cette « Toll-like » protéine entraînait l'activation de la voie de NF- κ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires.⁵ Dix TLRs ont depuis été découverts chez l'Homme, chacun montrant un degré de spécificité pour la reconnaissance de PAMPs. Les TLRs sont également capables de reconnaître des signaux endogènes indicateurs de dommages cellulaires : les DAMPs (*Dammage-Associated Molecular Patterns*).⁶ Les DAMPs sont des facteurs endogènes situés le plus souvent dans le noyau ou le cytoplasme des cellules en situation physiologique. En cas de stress ou de lésions cellulaires d'origine septique ou stérile et induisant une nécrose, ces facteurs sont libérés dans le milieu extracellulaire et peuvent induire une réponse inflammatoire. D'autres DAMPs sont d'origine extracellulaire, notamment certaines protéines de la matrice extracellulaire dont l'intégrité est lésée, comme les produits de dégradation de l'acide hyaluronique libérés en cas de dommage vasculaire. Il est aujourd'hui clairement admis que l'activation des TLR-2 et -4 par ces DAMPs est

impliquée dans la genèse d'une réponse inflammatoire stérile, comme par exemple au cours de phénomène d'ischémie/reperfusion.⁷

La rencontre entre des PAMPs/DAMPs et leurs TLRs respectifs a pour conséquence d'initier une réponse inflammatoire. Parallèlement à ce phénomène, il existe des mécanismes de modulation de cette réponse au niveau protéique. Certains récepteurs sont en effet capables d'amplifier l'activation leucocytaire parallèlement à la reconnaissance des signaux de danger. DAP12 (*DNA activating protein 12*) est une protéine accessoire très impliquée dans ces mécanismes de modulation. Parmi les partenaires de DAP12, le mieux caractérisé est TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells-1*), récepteur capable d'amplifier la réponse inflammatoire induite par les TLR-2 et -4.

1.2 STRUCTURE ET FONCTION DE TREM-1

TREM-1 est un récepteur activateur appartenant à une famille de récepteurs de type immunoglobuline (Ig) récemment identifiée : la famille des TREM. Au sein de cette famille, au moins un autre récepteur activateur a été mis en évidence chez l'Homme, TREM-2, ainsi qu'un récepteur exprimé par les plaquettes, TLT-1 (*Trem-Like Transcript-1*).⁸ Les gènes de la famille TREM sont clustérisés sur le chromosome 6p21.⁹ TREM-1 consiste en une région extracellulaire de 194 acides aminés, une région transmembranaire de 29 acides aminés et une courte portion intra-cytoplasmique de 5 acides aminés. La portion extracellulaire comporte un domaine de type Ig V. Cette portion est connectée à la région transmembranaire par un fragment de 60 acides aminés qui comporte trois sites de N-glycosylation. La partie transmembranaire contient un résidu lysine qui s'associe à un résidu aspartique appartenant à DAP12 : c'est ainsi qu'est formé le partenariat entre TREM-1 et sa protéine adaptatrice.¹⁰ L'activation de TREM-1 induit une signalisation complexe qui conduit à une mobilisation calcique intracellulaire, à un réarrangement du cytosquelette et à l'activation de facteurs transcriptionnels tels que NF- κ B. Tout cela résulte en une production de métalloprotéases, de cytokines pro-inflammatoires et de nombreuses chimiokines dont les interleukines (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , et d'une dégranulation des neutrophiles.¹¹

Le rôle amplificateur de la réponse inflammatoire rempli par TREM-1 a été confirmé par plusieurs études. Lorsque TREM-1 est activé en présence d'un ligand pour les TLR-2 ou -4, une nette surproduction de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) est induite.¹² Parallèlement, l'engagement des TLRs induit une surexpression de TREM-1.¹³ Tout ceci

plaide en faveur d'une collaboration étroite entre les TLRs et TREM-1 dans la genèse de la réponse inflammatoire avec, à l'évidence, une majoration de cette réponse en cas d'engagement de TREM-1.

1.3 LR12, UN INHIBITEUR DE TREM-1

Malgré toutes les recherches effectuées sur TREM-1, son ligand naturel n'est toujours pas connu, bien que les sites de reconnaissance soient prédits par les analyses cristallographiques.¹⁴ Aux côtés d'une forme membranaire, un fragment soluble de TREM-1 (sTREM-1) est libéré par clivage du domaine extracellulaire. Cette forme soluble agit comme un leurre pour le ligand naturel de TREM-1 qui existe également sous forme soluble, au moins chez les patients septiques, et s'oppose ainsi à l'activation de TREM-1.¹⁵ Cette forme soluble est donc un biomarqueur reflétant l'activation de TREM-1.

TLT-1 (*Trem like transcript-1*) est un autre membre de la famille TREM, exprimé uniquement par les mégacaryocytes et les plaquettes. Il est présent au sein des granules *alpha* des plaquettes non activées, et à leur surface membranaire après activation. Il est notamment impliqué dans l'agrégation plaquettaire. Il a été retrouvé de façon inattendue un effet anti-inflammatoire de la portion extracellulaire soluble de TLT-1, similaire à celui observé avec sTREM-1.¹⁶ Or, TREM-1 et TLT-1 partagent une grande homologie de séquence au niveau génique.

Plusieurs peptides ont alors été synthétisés, dont un, LR12, a rempli l'ensemble du cahier des charges, à savoir :

- posséder une forte homologie entre les séquences humaine et murine de TREM-1 et TLT-1,
- comprendre les sites de reconnaissance prédits par cristallographie (boucles de type CDR (*complementary determining regions*)),
- interagir directement avec le ligand de TREM-1 (figure 1).¹⁷

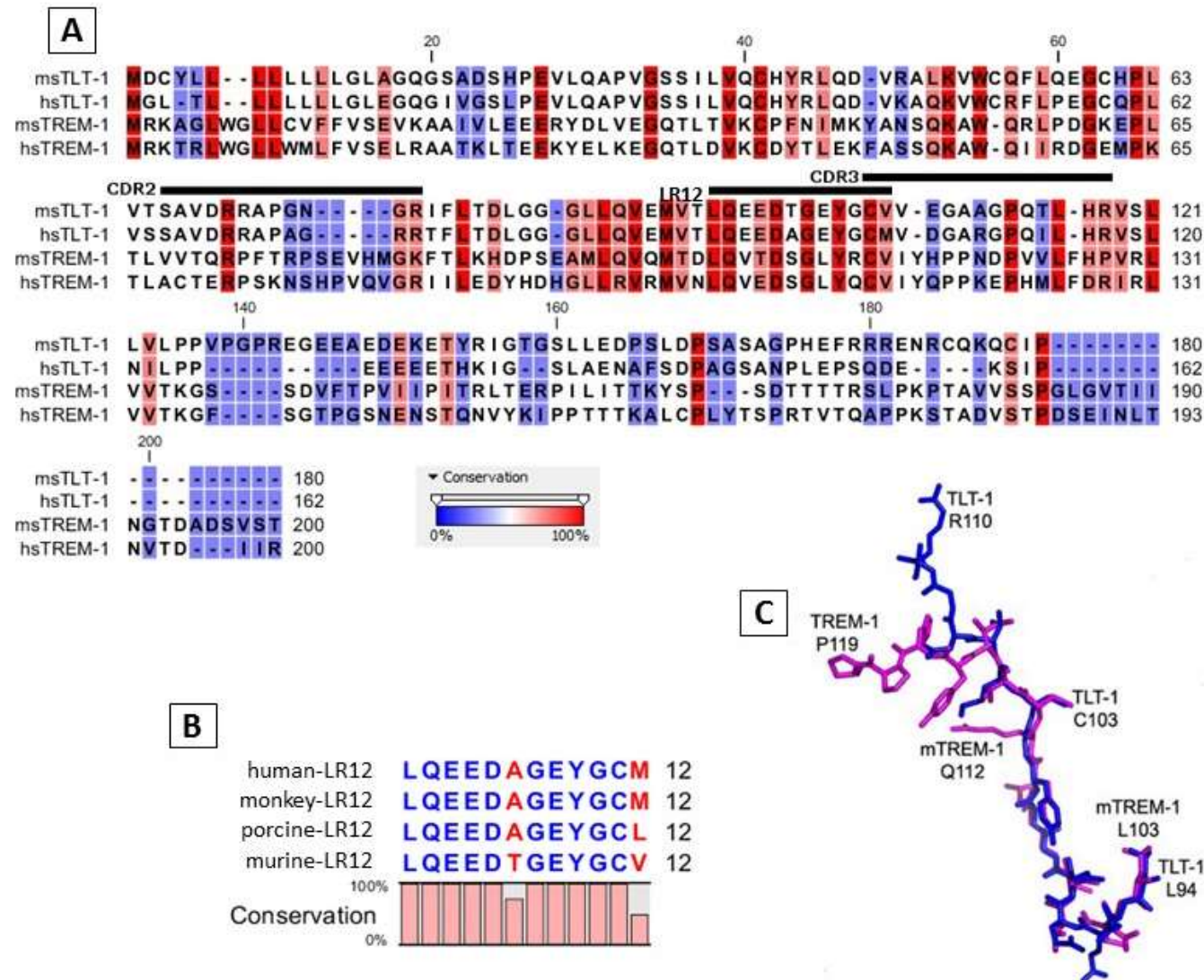


Figure 1 : gène d'un inhibiteur de TREM-1 (adapté de Kelker *et al*, 2004)¹⁴

A : illustration de l'homologie des séquences des portions extracellulaires des protéines murines (ms) et humaines (hs) TLT-1 et TREM-1, avec emplacements des CDR-2 et -3 (*complementary determining region*) ainsi que de la séquence LR12. **B** : conservation de la séquence LR12 entre différentes espèces (humaine, primate, porcine et murine). **C** : illustration tridimensionnelle des protéines TLT-1 et TREM-1 murines mettant en évidence leurs similitudes structurelles.

2. INFARCTUS DU MYOCARDE ET INFLAMMATION

2.1 GENERALITES

L'infarctus du myocarde est une nécrose ischémique systématisée du muscle cardiaque, le plus souvent due à une thrombose occlusive brutale d'une artère coronaire. Cette occlusion coronaire aiguë par un thrombus survient en règle générale sur une plaque d'athérome devenue instable à la suite d'une érosion, d'une ulcération, d'une fissuration ou d'une rupture.

L'infarctus du myocarde constitue une urgence cardiologique. Selon des données OMS, sur 50 millions de décès annuels dans le monde, les cardiopathies ischémiques sont la première cause de décès avec 7,2 millions de décès d'origine coronaire, dont 1,8 millions en Europe.¹⁸ En France, son incidence reste encore élevée 120 000 cas par an et est responsable de 10 à 12% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte.

La corrélation qui existe entre la durée de la période d'ischémie myocardique, la taille de la zone infarctée et le pronostic est connue depuis le début des années 1970,¹⁹ ce qui a conduit au développement des stratégies actuelles de prise en charge basées sur la rapidité de mise en œuvre des stratégies de reperfusion coronaire. La généralisation de l'angioplastie coronaire, des traitements fibrinolytiques et antithrombotiques a permis une baisse significative de la mortalité précoce de 65% au cours des 15 dernières années, qui se situe actuellement aux alentours de 4 à 6% dans les grands essais randomisés.²⁰ Mais ces chiffres encourageants ne doivent pas occulter l'incidence de l'insuffisance cardiaque post-infarctus qui reste élevée.²¹ Aujourd'hui, la diminution de la durée d'ischémie myocardique se heurte à de nombreux obstacles (éducation de la population, durée de transport en salle de cathétérisme cardiaque, contraintes géographiques...), rendant peu probable une réduction significative des délais de reperfusion. Les améliorations thérapeutiques doivent donc désormais se focaliser sur les phases qui succèdent à l'ischémie, soit immédiatement après celle-ci, lors de la reperfusion, soit plus à distance, lors du remodelage ventriculaire. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses avancées ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors la cicatrisation myocardique.

2.2 LÉSIONS DE REPERFUSION MYOCARDIQUE

2.2.1 Définition

A la phase aiguë d'un infarctus du myocarde, une reperfusion précoce est la stratégie la plus efficace pour réduire la taille de la zone infarctée. Mais la restauration du flux sanguin dans le myocarde ischémique peut, en elle-même induire des lésions. Depuis leur description initiale par Jennings *et al* en 1960, des études animales ont confirmé que les lésions de reperfusion myocardique pouvaient représenter jusqu'à 50% de la taille finale de l'infarctus.^{22,23} La nécrose est le mécanisme majoritaire de mort des cardiomyocytes durant la phase d'ischémie, conséquence directe d'une privation en oxygène. Néanmoins, un pourcentage non négligeable de cardiomyocytes disparaît secondairement à des phénomènes d'apoptose.²⁴ La preuve définitive du « paradoxe de la reperfusion » a été apportée récemment en mettant en évidence que des interventions dites de post-conditionnement, qui n'ont lieu qu'au moment de la désobstruction coronaire, sont capables de réduire significativement la taille de l'infarctus final, aussi bien chez l'animal que chez l'Homme.²⁵ La reperfusion est responsable de quatre types de dysfonction myocardique : la sidération myocardique, les arythmies de reperfusion, le phénomène de « no-reflow » par lequel des altérations de la microcirculation compromettent la restauration du flux sanguin, et les lésions de reperfusion létales entraînant une mort cellulaire. La pathogénie de ces dernières reflète la mise en place de nombreux processus biochimiques et cellulaires comme les espèces radicalaires de l'oxygène, les canaux ioniques, la dysfonction mitochondriale et l'inflammation.

2.2.2 Acteurs physiopathologiques

La transition de perméabilité mitochondriale caractérise la perte de l'imperméabilité constitutionnelle de la membrane mitochondriale interne, à l'origine de la perte du gradient électrochimique (ou force protomotrice) indispensable à son rôle énergétique. Durant la reperfusion, ce phénomène de perméabilisation se produit, résultat de l'ouverture d'un canal non sélectif appelé « pore de transition de perméabilité » (*mitochondrial permeability transition pore*), mPTP. L'ouverture du mPTP entraîne un découplage de la chaîne respiratoire, et la libération dans le cytosol de nombreuses molécules pro-apoptotiques par le biais de l'activation des caspases. Lors de la reperfusion, de nombreux facteurs concourent à son ouverture :

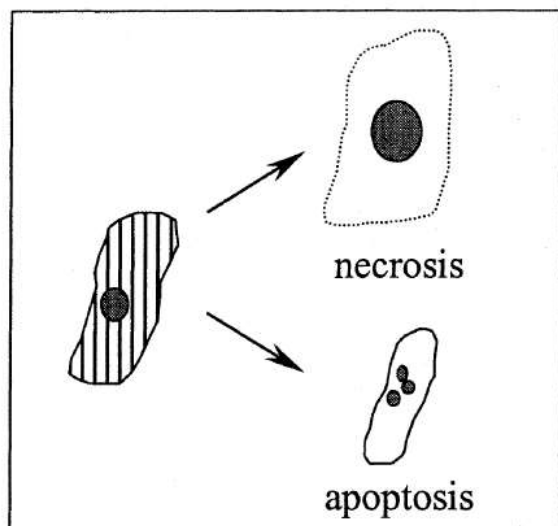
- les espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Les études expérimentales ont établi que la reperfusion générait un stress oxydatif intense et néfaste dans le myocarde ischémié.²⁶ Il se crée rapidement un déséquilibre entre la production d'ERO et les mécanismes endogènes antioxydants. Les nombreuses dénaturations lipidiques et protéiques induites contribuent au déclenchement de l'apoptose²⁷.
- la surcharge calcique. Parmi les anomalies ioniques constatées durant la reperfusion – surcharges potassique, sodique et calcique – cette dernière semble la plus sévère, tant au niveau cytosolique qu'au niveau intra-mitochondrial. Cette surcharge est secondaire aux lésions de la membrane sarcolemmale ainsi qu'à la dysfonction du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation de la concentration calcique entretient le cercle vicieux des lésions de reperfusion en facilitant l'ouverture du mPTP, en favorisant l'activation de nombreuses enzymes productrices d'ERO (NO synthases notamment) et en entraînant une hypercontractilité des myofibrilles avec déplétion en ATP et aspect de sidération myocardique.²⁸

2.3 REMODELAGE VENTRICULAIRE

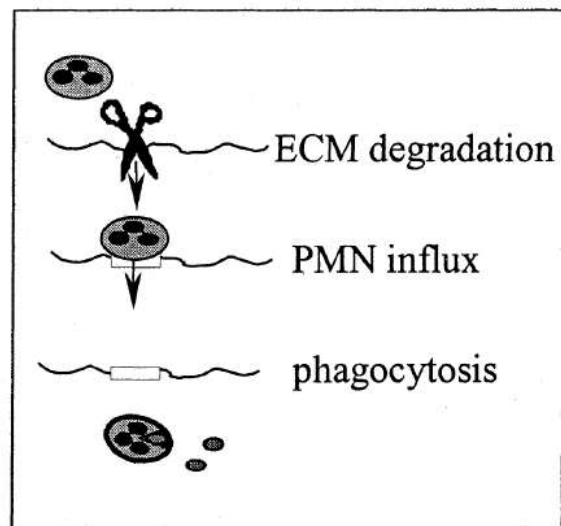
2.3.1 Définition

Le remodelage ventriculaire est un processus progressif qui débute très précocement après l'infarctus, bien que ses conséquences cliniques ne soient souvent visibles qu'après plusieurs mois voire années. Il est défini comme « l'expression génomique de modifications moléculaires, cellulaires et interstitielles, qui se manifestent cliniquement par un changement de taille, de morphologie et de forme du ventricule ».²⁹ Ce remodelage ne concerne pas uniquement la zone infarctée qui a tendance à s'étendre et à s'affiner, mais également les segments myocardiques sains qui s'hypertrophient dans un premier temps, puis s'affinent et se dilatent par apoptose et dysjonction des cardiomyocytes en raison de la perte des connexions intercellulaires (« *myocyte slippage* »).³⁰ Ce remodelage cardiaque, qui concerne tous les aspects structuraux et fonctionnels du cœur, de la géométrie ventriculaire aux molécules constitutives des cardiomyocytes et autres cellules du myocarde, peut parfois être nécessaire afin de maintenir un débit cardiaque suffisant, mais fait également souvent le lit de l'insuffisance cardiaque.³¹ La frontière entre remodelage adaptatif et maladaptatif reste malheureusement floue et extrêmement variable d'un individu à l'autre.

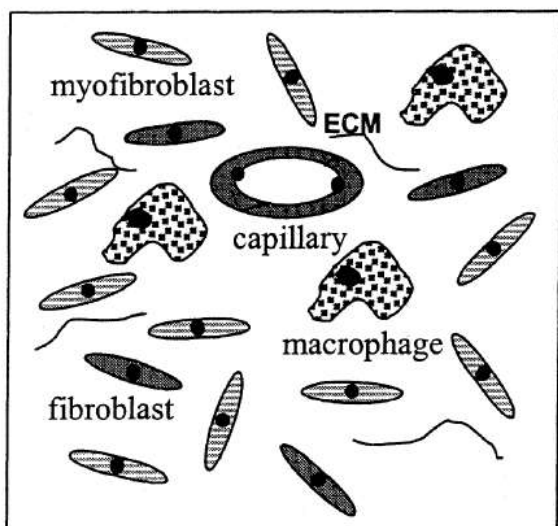
Chez les mammifères adultes, le cœur a des capacités régénératives négligeables. La nécrose d'une partie du myocarde va activer une réponse réparatrice qui aboutit au remplacement du tissu nécrotique par un tissu cicatriciel.³² Ce processus de cicatrisation peut être divisé en 4 phases distinctes mais qui se chevauchent spatialement et temporellement (figure 2)³³ La première phase est caractérisée par la mort de nombreuses cellules par nécrose et apoptose. Après 15 à 20 minutes d'ischémie, les cardiomyocytes subissent des altérations irréversibles qui aboutissent à la mort cellulaire. Les cardiomyocytes situés au niveau sous-endocardique sont plus sensibles à l'ischémie. Progressivement, un front de nécrose s'étend des couches sous-endocardiques vers les couches sous-péricardiques. Rapidement, la phase inflammatoire débute. L'activation de signaux de l'immunité innée (système du complément et libération de nombreuses cytokines) entraîne le recrutement massif de neutrophiles et de monocytes pro-inflammatoires qui vont participer à la déterction du foyer de nécrose (débris cellulaires et matriciels). L'apoptose des neutrophiles et la maturation des monocytes en macrophages marquent la transition vers la phase proliférative. Au cours de cette troisième phase marquée par la formation d'un tissu de granulation en périphérie de la zone infarctée, l'inhibition de l'environnement pro-inflammatoire et la modification de l'infiltrat leucocytaire au profit de macrophages aux phénotypes angiogéniques et fibrogéniques va favoriser la différenciation et la croissance de myofibroblastes et de cellules endothéliales. Ces éléments participent au développement de nouveaux vaisseaux sanguins et à la synthèse de nouvelles protéines de la matrice extra-cellulaire (fibrine, fibronectine puis collagènes).³⁴ Parallèlement à cette néosynthèse, la dégradation de la matrice extra-cellulaire pré-existante se poursuit, permettant la migration des cellules vers la zone infarctée.³⁵ Le déploiement de myofibroblastes aux propriétés contractiles au sein de la zone infarctée participe au maintien de la zone ischémique et permet de faire face aux forces d'étirement engendrées par le fonctionnement cardiaque.³⁶ La quatrième et dernière phase du remodelage correspond à la maturation de la cicatrice. Au cours cette phase, le nombre de cellules au sein du tissu de granulation décroît par le biais de phénomènes apoptotiques, et le réseau collagène se densifie et s'organise (« cross-linking »).³⁷



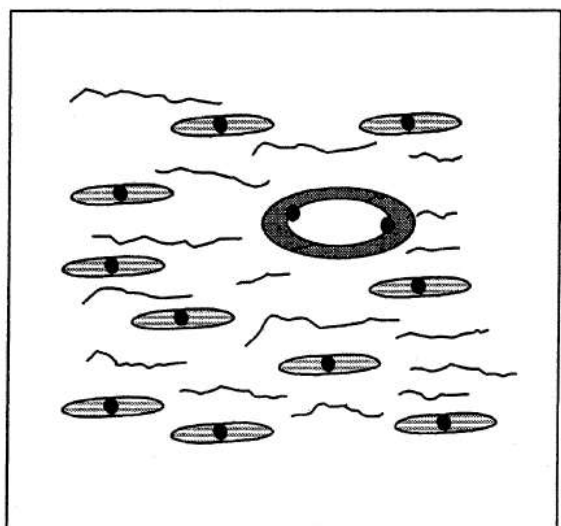
Phase 1



Phase 2



Phase 3



Phase 4

Figure 2 : Les différentes phases du remodelage ventriculaire post-infarctus (d'après Blankesteyn et al)³⁴

La première phase correspond à la mort cellulaire (principalement des cardiomyocytes) par nécrose ischémique ou apoptose. La deuxième phase, inflammatoire, est caractérisée par la dégradation de la matrice extra-cellulaire (ECM) et par le recrutement de cellules inflammatoires, essentiellement des neutrophiles (PMN) et des monocytes. La troisième phase, proliférative, voit se mettre en place un tissu de granulation en périphérie de la zone infarctée, composé de nouveaux capillaires, de macrophages et de myofibroblastes. Ce tissu s'étend progressivement vers le centre de la zone infarctée. Au cours de la quatrième phase dite de maturation, le tissu de granulation se transforme en cicatrice fibreuse pauci-cellulaire, à l'exception des myofibroblastes qui y persistent plusieurs années.

2.3.2 Remodelage de la matrice extra-cellulaire

Les changements dynamiques qui se produisent au sein du tissu de soutien myocardique contribuent directement au remodelage ventriculaire. La matrice extra-cellulaire myocardique est en effet une entité dynamique dont la composition et le turn-over sont profondément modifiés après un infarctus. Plus que pour n'importe quel autre organe, la matrice myocardique joue un rôle majeur en termes de soutien et d'organisation des éléments cellulaires. En effet, l'orientation des cardiomyocytes et des fibres myocardiques est hautement organisée. Un réseau protéique matriciel parfaitement agencé, composé principalement de collagènes de type I et III, oriente les cardiomyocytes et orchestre leur contraction, permettant au final d'assurer la fonction « pompe » du cœur. En plus de ce réseau de collagène fibrillaire, la matrice extra-cellulaire est un large réservoir de molécules bio-actives telles que l'angiotensine II, l'endothéline-1, le TNF- α ou le TGF- β .³⁸ Après un infarctus, des altérations significatives se produisent au sein de la matrice myocardique en termes de composition et de structure. Très précocement lors de la phase inflammatoire, la matrice au niveau du foyer de nécrose subit une dégradation, ce qui va faciliter la pénétration des éléments cellulaires nécessaires à la constitution d'une cicatrice. Parmi les effecteurs moléculaires de cette protéolyse, les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs) occupent une place prépondérante. Il existe de nombreuses isoformes de MMPs, que l'on peut classer en fonction de leur affinité pour différents substrats. Ainsi, au sein du myocarde, les MMP-1, -8 et -13 possèdent une haute affinité pour le collagène fibrillaire, alors que les MMP-2 et -9 sont actives sur le collagène fibrillaire dénaturé et sur les protéines des membranes basales (collagène de type IV, laminine, fibronectine). La transcription des différents gènes codant pour les MMPs est sous la dépendance de plusieurs facteurs transcriptionnels comme NF- κ B ou AP-1, notamment activés par les voies de signalisation du TNF- α et de l'IL-1 β , prototypes des cytokines pro-inflammatoires.^{39,40} D'autres facteurs peuvent accroître la transcription des gènes codants pour les MMPs, tels qu'un stress mécanique ou certaines molécules bioactives (ostéopontine, thrombospondine).⁴¹⁻⁴³ Certains facteurs de croissance comme TGF- β 1 peuvent au contraire inhiber leur transcription (figure 3).⁴⁴

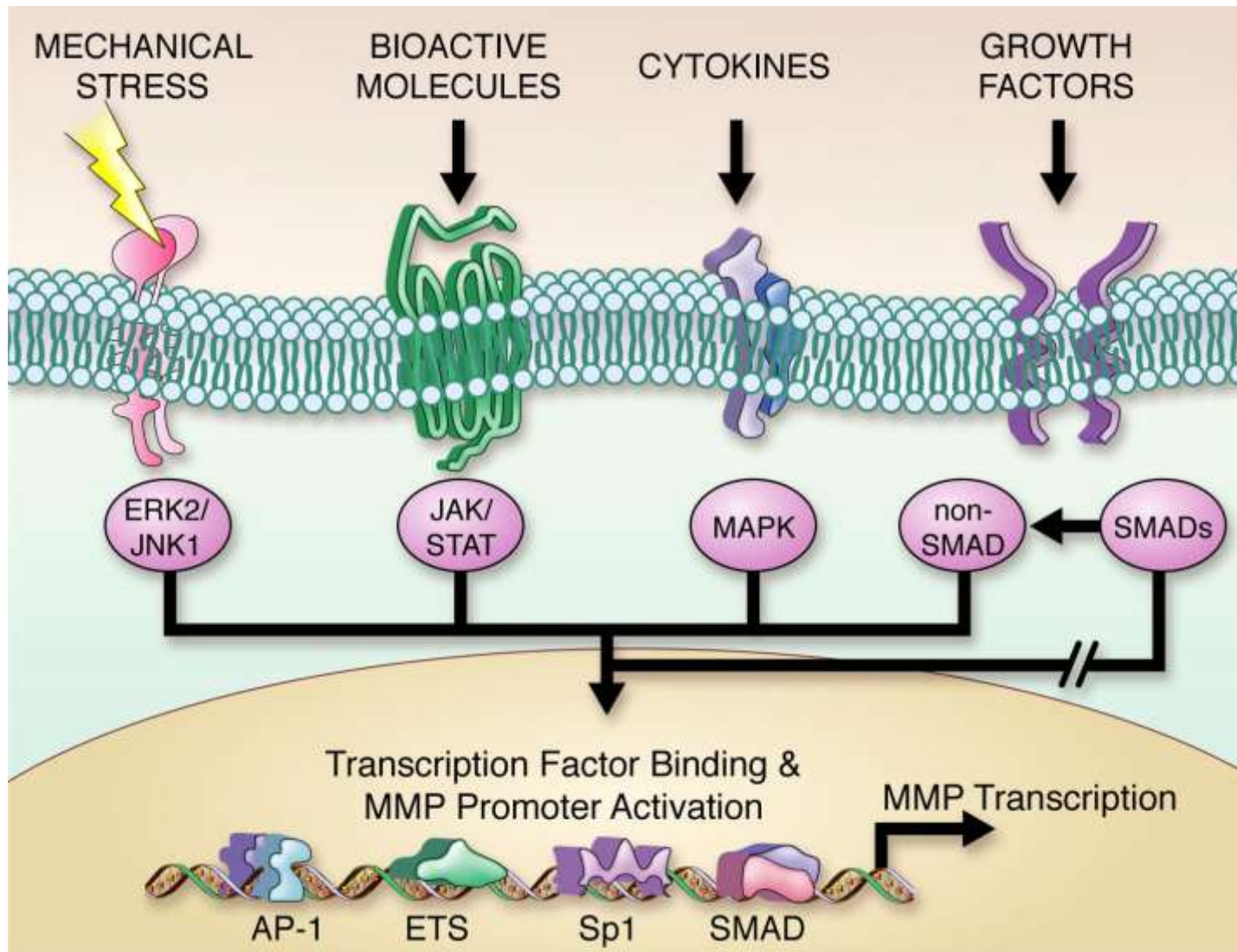


Figure 3 : Régulation transcriptionnelle des MMPs myocardiques (d'après Spinale, 2007)³⁸

Plusieurs facteurs transcriptionnels (AP-1, ETS, Sp1) se lient à des promoteurs des gènes des MMPs. La formation de ces facteurs transcriptionnels au sein des cellules myocardiques est sous la dépendance de stimulus extracellulaires (cytokines, molécules bioactives) et de signaux mécaniques. Cependant, certains facteurs peuvent inhiber leur transcription, comme TGF- β 1 via SMAD.

Les MMPs peuvent subir une autodigestion, mais c'est un phénomène de rétrocontrôle négligeable en comparaison à leur inhibition par les TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*), une famille de protéines comprenant 4 représentants.³⁸ La balance MMPs/TIMPs est un déterminant critique du turn-over de la matrice extra-cellulaire. Par ailleurs, certains TIMPs possèdent une activité anti-apoptotique indépendante de leur action d'inhibition des MMPs.⁴⁵

Lors d'études post-mortem précoces après un infarctus du myocarde, il a été retrouvé une augmentation nette de l'activité des MMP-2 et -9 au sein du myocarde infarcté.⁴⁶ De nombreuses études animales ont confirmé l'augmentation de ces MMP au cours de la première semaine post-infarctus, ainsi qu'une diminution de TIMP-1, en faveur d'une dégradation importante des composants matriciels.⁴⁷ Chez différentes espèces animales, la mise en évidence d'une relation entre activité protéolytique et remodelage ventriculaire a conduit à l'essai de différents inhibiteurs de MMPs.⁴⁸⁻⁵⁰ Un premier essai clinique (the PREMIER study) n'a cependant pas retrouvé d'effet bénéfique de l'inhibition non sélective des MMPs sur une période de 6 mois après un infarctus du myocarde.⁵¹ Les recherches se concentrent désormais sur des inhibiteurs plus sélectifs ou sur la doxycycline qui possède, outre ses propriétés antibiotiques, un effet inhibiteur des MMPs.⁵²

2.3.3 Rôle des systèmes neurohormonaux

Les systèmes bêta-adrénergiques et rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) sont particulièrement impliqués dans les nombreux événements qui surviennent au niveau des cardiomyocytes et du compartiment extracellulaire pour aboutir aux changements structuraux et géométriques du remodelage ventriculaire. La stimulation chronique des récepteurs β -adrénergiques est à l'origine d'effets délétères au niveau myocardique, notamment en activant de nombreux gènes impliqués dans le développement d'une hypertrophie cardiomyocytaire, d'un état pro-fibrosant et également pro-apoptotique. Cinq principaux mécanismes d'action de la stimulation β -adrénergique ont à ce jour été mis en cause : l'activation de la voie de signalisation des MAPK, la voie de signalisation « protéine Gs – adénylate cyclase –AMP cyclique », la voie de signalisation « Ca^{2+} - calcineurine – NFAT / CaMKII – HDACs, la voie de signalisation de PI3K et la voie de signalisation dépendante du récepteur β_3 -adrénergique (figure 4).⁵³ Par ailleurs, il a été retrouvé que la stimulation excessive du système β -adrénergique myocardique augmente la production locale d'angiotensine II et d'enzyme de conversion de l'angiotensine.⁵⁴ De nombreuses études cliniques ont confirmé le bénéfice en

termes de mortalité mais également en termes de limitation du remodelage de l'inhibition chronique du système β -adrénergique par des traitements bêta-bloquants.^{55,56}

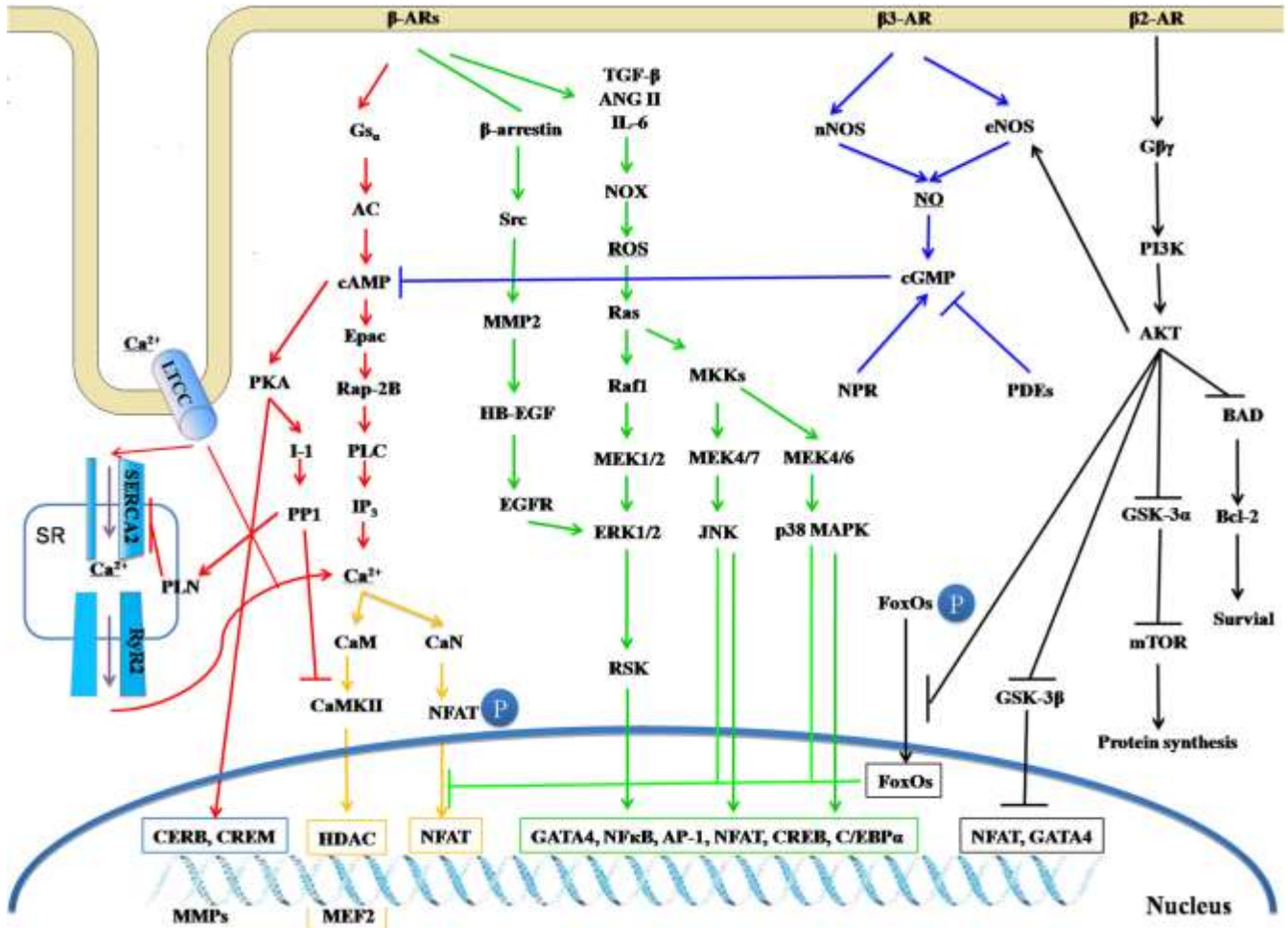


Figure 4 : voies de signalisation du système β -adrénergique au cours du remodelage ventriculaire post-infarctus (d'après Yang *et al*, 2014)⁵³

Le SRAA, principalement par l'intermédiaire de ses effecteurs finaux, l'angiotensine II et l'aldostérone, exerce de nombreux effets au niveau myocardique. L'angiotensine II possède de multiples effets cytotoxiques directs sur les cardiomyocytes : induction de l'apoptose, stimulation de l'hypertrophie et de la fibrose, par l'intermédiaire de son récepteur de type 1.³¹ L'aldostérone joue également un rôle dans le remodelage ventriculaire en favorisant la fibrose myocardique, par une stimulation de la synthèse de collagène.⁵⁷ De même que pour le S- β A, le blocage du SRAA est bénéfique en termes de mortalité et de remodelage ventriculaire en post-IDM, et ce quel que soit le niveau de blocage : inhibiteurs de

l'enzyme de conversion de l'angiotensine, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, anti-aldostérone.⁵⁸⁻⁶⁰ Le blocage pharmacologique de ces deux systèmes neurohormonaux fait donc actuellement partie du traitement recommandé chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et a fortiori d'origine ischémique.⁶¹

2.4 REPONSE IMMUNITAIRE

Dès la phase initiale de l'infarctus, la nécrose massive de cardiomyocytes initie une réponse inflammatoire intense mettant en jeu au premier plan le système immunitaire inné, mais également les cellules de la réponse adaptative. Au cours des 30 dernières années, un nombre considérable de travaux expérimentaux suggèrent que cette réponse immunitaire, bien que nécessaire à la détersion du foyer de nécrose et à la constitution d'une cicatrice fibreuse, va également aggraver l'étendue des lésions et accentuer le remodelage ventriculaire maladaptatif.⁶²

2.4.1 Initiation de la réponse immunitaire

La nécrose cellulaire et la fragmentation de la matrice va générer de nombreux signaux de danger qui activent la réponse immunitaire innée. Parmi les DAMPs libérés, HMGB1 (High mobility group box-1) joue un rôle crucial dans l'initiation de la réponse inflammatoire via sa reconnaissance par des TLRs et le récepteur RAGE (receptor for advanced glycation endproducts).⁶³ Les HSPs (heat shock proteins) et les fragments de matrice (comme les fragments d'acide hyaluronique ou de fibronectine) servent également de signaux de danger activant la réponse immunitaire.⁶⁴

Les TLRs participent à l'initiation et à l'entretien de la réponse inflammatoire post-infarctus. Les TLR-2 et -4 ont été les plus étudiés au cours de cette pathologie (cf. infra, chapitre 3 : justification de l'étude de TREM au cours de l'infarctus du myocarde).

Les DAMPs activent aussi une autre cascade de la réponse immunitaire innée, le système du complément. Les trois voies du complément (voie classique, voie alterne et voie des lectines) sont impliquées au cours de l'infarctus du myocarde, mais les études les plus récentes concluent à l'importance particulière de la voie des lectines.⁶⁵ Le complément participe au recrutement des cellules inflammatoires dans le myocarde, et son inhibition limite l'infiltrat cellulaire post-infarctus.⁶⁶

La production d'ERO participe à l'activation des cellules immunitaires au sein de la zone infarctée. Les ERO accentuent le chimiotactisme leucocytaire en activant le complément, en stimulant l'expression de molécules d'adhésion (P-selectin) et en up-régulant la synthèse de cytokines et de chimiokines par la voie de signalisation de NF- κ B.⁶⁷ Parallèlement à ces effets pro-inflammatoires potentiellement délétères, les ERO contribuent à la réparation cardiaque en promouvant l'angiogénèse.⁶⁸

Au sein du myocarde infarcté, les voies de signalisation médiées par les TLRs, activées par le complément ou induites par les ERO, convergent toutes vers l'activation de NF- κ B et induisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les fibroblastes, les leucocytes et les cellules vasculaires.⁶⁹ L'IL-1 participe à la synthèse de médiateurs chimiotactiques au sein de la zone infarctée et stimule le recrutement leucocytaire. La formation d'IL-1 β au sein de tissus inflammés nécessite la formation d'un complexe protéique spécialisé, l'« inflammasome ». En 2011, deux études ont éclairci le rôle de l'inflammasome au sein du myocarde infarcté.^{70,71} L'activation de l'inflammasome au sein de l'infarctus est localisée dans les leucocytes, dans les fibroblastes résidents ainsi que dans les cardiomyocytes situés en périphérie de la zone ischémique.

La cytokine pro-inflammatoire TNF- α est également produite et sécrétée en grande quantité dans le myocarde infarcté, et stimule la synthèse de cytokines par les mastocytes résidents.⁷² Cependant, TNF- α possède aussi des effets cytoprotecteurs par le biais de son interaction avec son récepteur TNFR2, aboutissant à une diminution de l'activation de NF- κ B.⁷³

L'IL-6 et les autres représentants de cette famille de cytokines (cardiotrophin-1, oncostatin-M, leukemia inhibitory factor) sont up-régulés dans les modèles d'infarctus expérimental, et participent à la modulation des phases inflammatoires et réparatrices par le biais de voies de signalisation communes passant par la glycoprotéine transmembranaire gp130.⁷⁴ L'activation rapide puis la suppression en temps opportun de la voie de signalisation de gp130 joue un rôle important dans la régulation du remodelage post-infarctus. En effet, l'absence d'extinction de la voie de signalisation gp130/STAT3 résulte en une inflammation prolongée prédisposant au risque de rupture cardiaque.⁷⁵

Plusieurs membres de la famille des chimiokines sont impliqués dans la phase inflammatoire post-infarctus et agissent comme des médiateurs majeurs pour le recrutement

des différentes populations leucocytaires. Les chimiokines CC attirent principalement les monocytes, les chimiokines CXC avec motif tripeptidique ELR (glutamate – leucine – arginine) participent à l'attraction des neutrophiles et les chimiokines CXC non-ELR recrutent les lymphocytes. Leur action chimiotactique est dépendante de leur immobilisation sur les glycosaminoglycanes présents à la surface endothéliale ou au sein de la matrice extra-cellulaire (figure 5).

2.4.2 Les effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire post-infarctus

Les neutrophiles sont la première sous-population leucocytaire à massivement infiltrer le myocarde après infarctus. Deux étapes régulent la diapédèse des neutrophiles depuis le vaisseau vers le myocarde. En premier lieu, les neutrophiles roulent à la surface des cellules endothéliales par le biais d'interactions entre des protéines de la famille des sélectines exprimées par les neutrophiles, et des molécules d'adhésion de type VCAM (vascular cell adhesion molecules) exprimées à la surface des cellules endothéliales activées (phase de « rolling »). Dans un deuxième temps, les neutrophiles s'arrêtent à la surface de l'endothélium (phase de « firm adhesion »). Cet arrêt est dépendant de l'interaction entre des intégrines exprimées à la surface des neutrophiles, principalement le complexe CD18/CD11b, et des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales (ICAM, intercellular adhesion molecules) (figure 5).⁷⁶ Les neutrophiles produisent de grandes quantités d'ERO, dont nous avons vu précédemment qu'elles participaient à la genèse d'un environnement pro-inflammatoire en activant la voie de NF- κ B. Les molécules contenues dans les granules des neutrophiles peuvent aussi être nocives pour le tissu myocardique. Ainsi, les taux de myéloperoxydase (MPO), protéinase 3 et NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) sont associés à une évolution défavorable chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde.^{77,78} Les neutrophiles peuvent aussi relarguer des MMPs, essentiellement MMP-8 et -9, qui participent à la dégradation de la matrice extra-cellulaire et intensifient la réaction inflammatoire à la phase précoce post-infarctus.

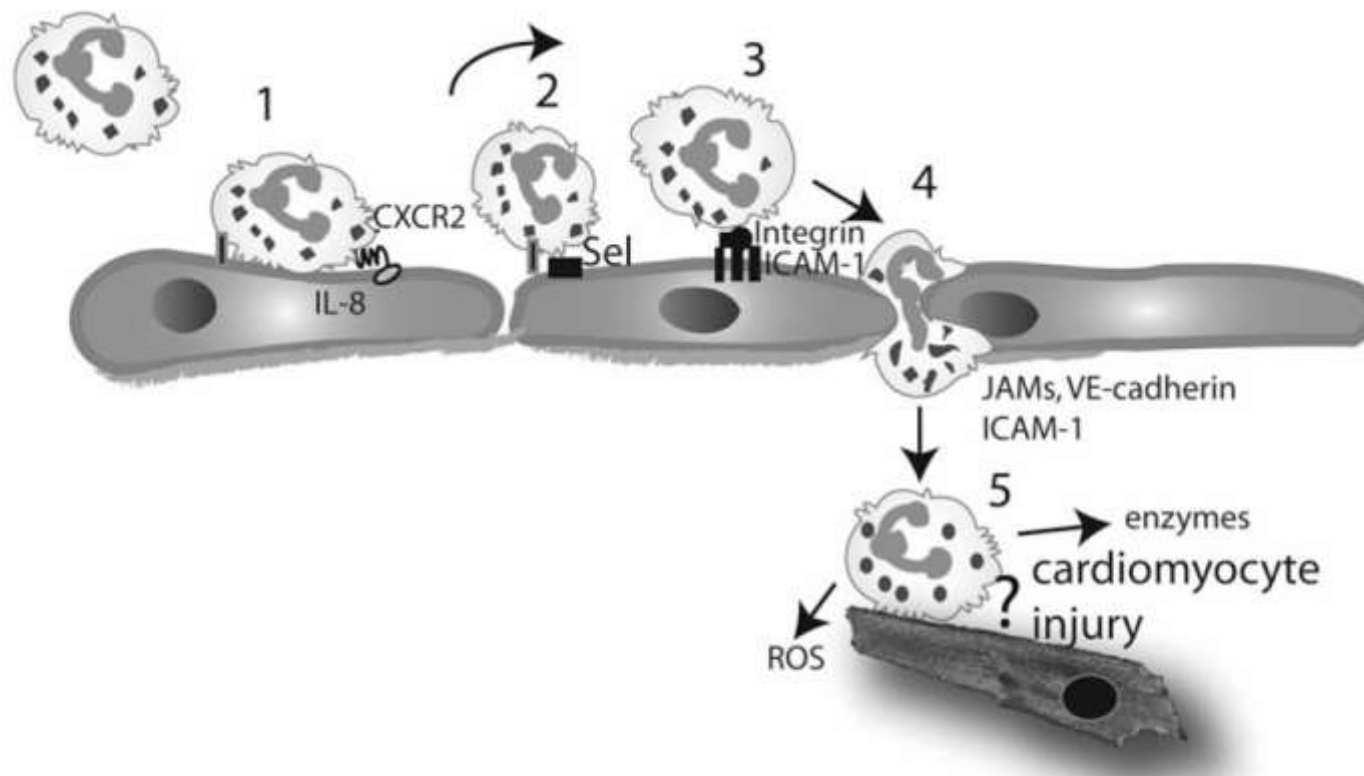


Figure 5 : Invasion du myocarde par les neutrophiles et les mécanismes pouvant induire des lésions cardiomyocytaires (d'après Frangogiannis, 2014).³³

Le passage des neutrophiles de la circulation sanguine vers le myocarde se déroule en plusieurs étapes. Ils sont tout d'abord « capturés » par les cellules endothéliales activées (1) puis ils roulent à leur surface par interaction de sélectines (2) avec des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales (VCAM). La présence de chimiokines (comme IL-8) induit l'expression d'intégrines par les neutrophiles qui permettent leur immobilisation à la surface vasculaire par interaction avec des molécules d'adhésion de type ICAM (3). Puis ils migrent à travers la couche endothéliale par extravasation (4), cette étape nécessitant l'expression de molécules d'adhésion comme VE-cadhérine, des molécules de la famille JAM ou ICAM. Une fois dans le myocarde, les neutrophiles relarguent des enzymes protéolytiques et produisent des ERO en grandes quantités.

La NETose est une forme de mort cellulaire du neutrophile, différente de l'apoptose, correspondant à la formation de NETs (*neutrophil extracellular traps*). Les neutrophiles relarguent des filets de chromatine décondensée avec des histones et des protéases. Ces NETs sont d'efficaces pièges à bactéries et limitent l'extension d'un foyer infectieux localisé. Cependant, ces NETs sont également thrombogéniques et cytotoxiques pour le tissu hôte. La présentation d'HMGB-1 par les plaquettes activées aux récepteurs de type RAGE des neutrophiles entraîne la formation de NETs, ce qui participe aux dommages myocardiques post-infarctus, notamment au cours des lésions d'ischémie-reperfusion.^{79,80}

Les neutrophiles participent au recrutement de la deuxième vague de cellules infiltrant le myocarde infarci : les monocytes/macrophages. Certaines molécules relarguées depuis les granules des neutrophiles (*azurocidin, cathelicidin antimicrobial peptide, cathepsin G*) facilitent le recrutement de cette population leucocytaire.⁸¹ Les neutrophiles produisent aussi de l'IL-6R soluble qui active l'expression de la chimiokine CCL2 et de VCAM1 par les cellules endothéliales, ce qui favorise le recrutement des monocytes circulants.⁸²

Les monocytes se différencient en macrophages après avoir migré des vaisseaux vers les tissus. Bien que les neutrophiles soient la première population leucocytaire à massivement infiltrer le myocarde, le recrutement des **monocytes/macrophages** commence bien plus précocement, dès les premières minutes d'ischémie.⁸³ Deux sous-populations monocytaires sont présentes chez la souris : une sous-population à phénotype pro-inflammatoire (monocytes Ly-6C^{high}, exprimant également Gr1^{high}, CCR2 et CX3CR1^{low}) et une sous-population à phénotype anti-inflammatoire (monocytes Ly-6C^{low}, exprimant également Gr1^{low} et CX3CR1^{high}), également appelés monocytes « patrouilleurs ». Les monocytes Ly-6C^{high} et Ly-6C^{low} correspondent respectivement aux monocytes CD14⁺CD16⁻ et CD14⁺CD16⁺ humains. Une étude récente utilisant une technique de microscopie intravitale au niveau du myocarde infarci chez des souris génétiquement modifiées exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) soit au niveau du gène *Cx3cr1* (monocytes patrouilleurs) soit au niveau de *LysM* (neutrophiles) a permis de montrer que les monocytes patrouilleurs infiltraient la zone bordante et le myocarde infarci dès la première demi-heure, en nombre plus important que les neutrophiles.⁸³

Cependant, la première phase d'infiltration massive monocyttaire est composée de la sous-population pro-inflammatoire Ly-6C^{high}, avec un pic numérique autour du 3^{ème} jour post-infarctus. Ces monocytes Ly-6C^{high}, essentiellement recrutés via l'interaction entre leur récepteur membranaire CCR-2 et la chimiokine CCL-2, expriment des cytokines pro-

inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , myéloperoxydase, MMPs) et des médiateurs protéolytiques (*cathepsin*, *plasminogen activator urokinase*) participant à la digestion du tissu infarcté et au nettoyage des débris nécrotiques.⁸⁴ La deuxième phase d'infiltration monocyttaire correspond au recrutement de monocytes Ly-6C^{low} en grand nombre avec un maximum numérique atteint entre les 4^{ème} et 7^{ème} jours. Ces monocytes Ly-6C^{low} expriment des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) et des facteurs de croissance comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et participent à l'accumulation de myofibroblastes, au développement d'un environnement pro-angiogénique et au dépôt de collagène, nécessaires à la phase de résolution de l'inflammation.⁸⁵

Les monocytes qui infiltrent le myocarde proviennent essentiellement de deux réservoirs, spléniques et médullaires (figure 6).⁸⁴ Un nombre substantiel des monocytes initialement recrutés provient de la pulpe rouge splénique, où de fortes concentrations d'angiotensine-II déclenchent leur mobilisation dans les heures qui suivent l'infarctus.⁸⁶ Au cours des premiers jours qui suivent l'infarctus, la production de progéniteurs médullaires augmente afin de répondre au recrutement leucocytaire massif constaté au sein du myocarde. L'activation du système sympathique participe à cet « effort de production », en activant des synapses neuro-immunes. En effet, la noradrénaline se lie aux récepteurs β -adrénergiques de type 3 exprimés par les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) présentes dans la moelle osseuse, et diminue la production de CXCL12, ce qui libère les cellules souches hématopoïétiques dans la circulation sanguine et favorise le développement d'une myélopoïèse extra-médullaire, essentiellement au niveau splénique.⁸⁷ La prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse est également sous la dépendance de nombreux facteurs de croissance comme G-CSF (granulocyte colony – stimulating factor) ou SCF (stem cell factor). Des données récentes suggèrent que ces progéniteurs hématopoïétiques peuvent percevoir directement les signaux de dangers via l'expression de TLRs.⁸⁸

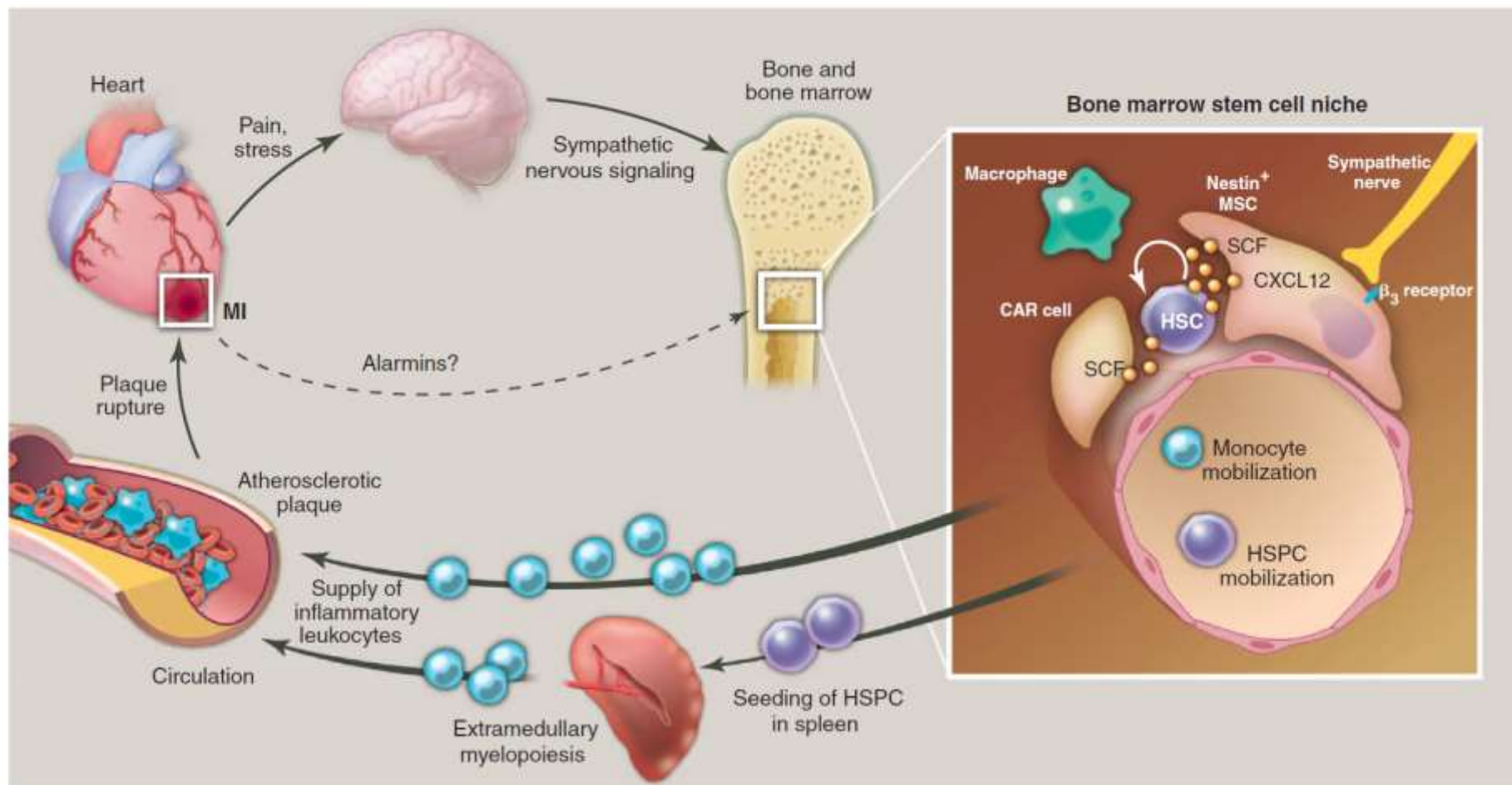


Figure 6 : origine des monocytes recrutés au sein du myocarde après infarctus (d'après Swirski et Nahrendorf, 2013)⁸⁴

Après infarctus du myocarde, l'activation du système sympathique et la présence d'alarmines entraîne une prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC) et le passage dans la circulation de progéniteurs hématopoïétiques (HSPC) à l'origine d'une myélopoïèse extra-médullaire, notamment splénique.

Les macrophages possèdent un nombre pléthorique de fonctions divergentes, et sont classés en différentes sous-populations en fonction de leur profil d'expression de certaines molécules, bien que les frontières entre ces différentes sous-populations soient souvent mal délimitées. Les macrophages de phénotype M1 correspondent aux macrophages cytotoxiques, capables de phagocytose, sécrétant de nombreuses protéases et des molécules oxydantes. Les M1 sont également appelés macrophages « inflammatoires ». Les macrophages de phénotype M2, ou macrophages « réparateurs », expriment un répertoire proche des monocytes Ly-6C^{low}. Le tissu myocardique sain est riche en macrophages résidents de type M2, qui se renouvellent par prolifération locale, sans recrutement de monocytes sanguins.⁸⁷ Après infarctus du myocarde, ces macrophages résidents sont numériquement dépassés par des macrophages de phénotype M1 au cours de la première semaine, puis par d'autres macrophages de phénotype M2. Cette infiltration biphasique rappelle bien évidemment l'infiltration monocyttaire également biphasique, mais l'origine « généalogique » des sous-populations macrophagiques n'est pas encore parfaitement élucidée à ce jour.⁸⁹ En effet, les macrophages M1 ne semblent pas uniquement dériver des monocytes Ly-6C^{high}, et il en est de même pour les macrophages M2 et les monocytes Ly-6C^{low}, bien que cette vision trop simpliste ait été longtemps acceptée.⁹⁰ En fait, il a récemment été montré que les monocytes Ly-6C^{high} se transformaient en macrophages de phénotype soit M1 soit M2, sous l'influence de différentes molécules dont NR4a1.⁹⁰ Dans ce même travail, il était retrouvé une capacité de prolifération locale des macrophages au sein du tissu myocardique infarcté (figure 7).

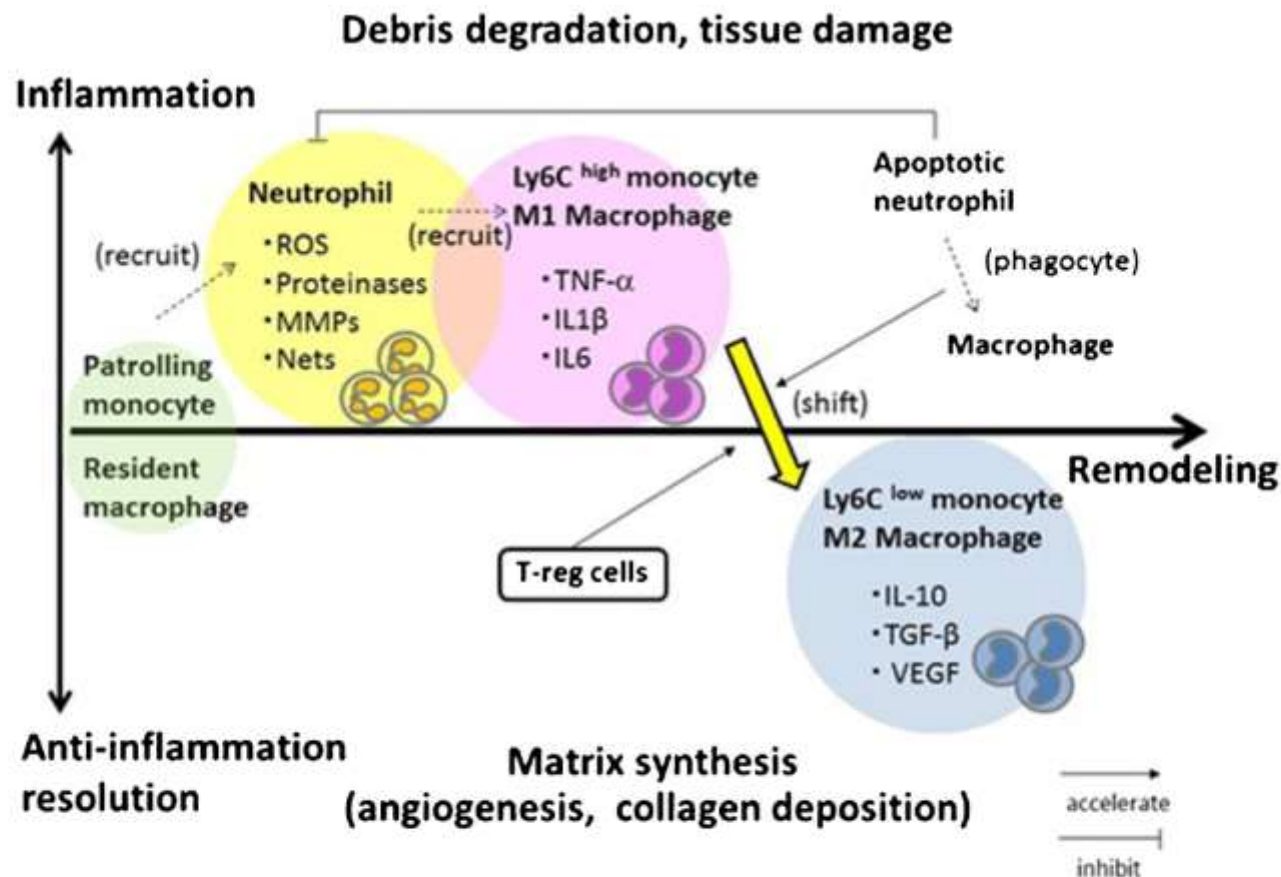


Figure 7 : Evolution temporelle de l'infiltrat inflammatoire au sein du myocarde après infarctus (d'après Frantz, 2015)⁸⁹

Les monocytes patrouilleurs (Ly-6C^{low}) infiltrent le myocarde dès les premières minutes d'ischémie et favorisent une première vague massive d'infiltration leucocytaire avec le recrutement des neutrophiles. Les neutrophiles participent ensuite au recrutement d'une deuxième vague leucocytaire composée de monocytes inflammatoires Ly-6C^{high} qui se transforment au sein du tissu myocardique en macrophages de phénotype inflammatoire M1. La présence de signaux « STOP » cellulaires (lymphocytes T régulateurs) et moléculaires (efferocytose) permettent une suppression de la réponse inflammatoire avec recrutement de monocytes Ly-6C^{low} et l'évolution des deux sous-populations monocytaires en macrophages de phénotype réparateur M2.

Les **mastocytes** sont des cellules résidentes du cœur sain, et sont préférentiellement localisées à proximité des vaisseaux sanguins. Les mastocytes résidents sont parmi les premières cellules à répondre à l'ischémie, et peuvent dégranuler d'importantes quantités de médiateurs pro-inflammatoires préformés comme le TNF- α ou l'histamine.⁷² Leur rôle après infarctus du myocarde est actuellement mal élucidé et probablement sous-estimé.

Bien que les cellules de l'immunité innée jouent le rôle principal au cours de la réponse immunitaire qui s'orchestre après infarctus, des travaux récents concluent à l'implication importante des cellules de l'immunité adaptative.⁹¹

Les **lymphocytes B** participent au recrutement de monocytes inflammatoires Ly-6C^{high} depuis la moelle osseuse par un mécanisme dépendant de la chimiokine CCL7.⁹² Dans un modèle expérimental murin, la déplétion en lymphocytes B par un traitement anti-CD20 permettait une réduction de la taille de l'infarctus. Par contre, le rôle potentiel de la synthèse d'auto-anticorps dirigés contre des épitopes myocardiques n'a pas encore été étudié dans cette pathologie.

Les **lymphocytes T CD4+** contribuent aux lésions de reperfusion au cours de l'infarctus du myocarde par le biais de la production d'IFN- γ .⁹³ Le mécanisme déclencheur de cette action délétère des lymphocytes T CD4+ n'est pas encore complètement élucidé puisque l'on ne sait pas s'il requiert une activation classique par reconnaissance d'un auto-antigène via le TCR ou s'il s'agit d'une activation non-classique « directe ». La rapidité de mise en œuvre plaide plutôt en faveur de cette deuxième option, par exemple par l'activation de récepteurs TLRs lymphocytaires par des molécules de danger libérées à la phase de nécrose.⁹¹ Au cours de la phase réparatrice, les lymphocytes T CD4+ semblent par contre participer à la résolution de l'inflammation (transition vers un phénotype macrophagique M2), au développement d'une néovascularisation et au dépôt de collagène.⁹⁴ Ce rôle bénéfique est vraisemblablement dépendant d'une sous-population minoritaire de lymphocytes T CD4+. À côté des lymphocytes conventionnels effecteurs, il existe une sous-population aux propriétés anti-inflammatoires puissantes, les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui expriment notamment le CD25 et FOXP3. La déplétion sélective de cette sous-population entraîne une disparition des effets bénéfiques des lymphocytes T CD4+ en termes de résolution de l'inflammation et de réparation myocardique.⁹⁵

Les **lymphocytes T CD8+** ont très peu été étudiés au cours de l'infarctus du myocarde, bien qu'ils possèdent tout l'arsenal nécessaire à une action délétère, notamment par

le biais de la libération de granzymes, impliquées dans l'apoptose et la dégradation de la matrice extra-cellulaire.⁹⁶ L'augmentation du taux circulant de granzyme B est d'ailleurs associé à la survenue d'un remodelage ventriculaire maladaptatif après infarctus chez l'Homme.⁹⁷ Un mécanisme de cytotoxicité liée à la reconnaissance antigénique et dirigée contre les cardiomyocytes a été retrouvée *in vitro*.⁹⁸

2.4.3 Résolution de la réponse inflammatoire

La réparation tissulaire optimale nécessite l'activation de signaux endogènes qui freinent la cascade inflammatoire et stimulent des voies réparatrices, angiogéniques et fibrogéniques. Ces signaux « STOP » sont particulièrement importants dans le contexte de lésion myocardique. Une réponse inflammatoire non contenue dans le temps et l'espace peut avoir des conséquences catastrophiques, aboutissant à une dégradation matricielle extensive, un remodelage ventriculaire maladaptatif et l'installation progressive d'une insuffisance cardiaque.⁶² Un des principaux signaux STOP est la mort cellulaire par apoptose, notamment des neutrophiles, et la clairance de ces cellules mortes par les phagocytes (mécanisme d'efferocytose), qui enclenche un programme inhibiteur permettant la résolution de la cascade pro-inflammatoire. Il a par exemple été retrouvé une prolongation de la phase pro-inflammatoire lorsque l'efferocytose des cardiomyocytes morts est perturbée.⁹⁹ Comme vu précédemment, les lymphocytes Treg sont impliqués dans cette phase de résolution inflammatoire en orientant la différenciation macrophagique vers un phénotype anti-inflammatoire et en modulant la synthèse de protéases par les fibroblastes myocardiques.^{95,100}

Au niveau moléculaire, la suppression de l'inflammation post-infarctus nécessite l'activation d'un réseau complexe de signaux STOP endogènes. L'IL-10 limite la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et contribue à la stabilisation de la matrice extra-cellulaire en induisant la synthèse de TIMPs. Le TGF- β possède des effets pléiotropes et participe à la suppression de la réponse immunitaire en orchestrant la transition de la phase inflammatoire vers la phase réparatrice avec dépôt de tissu fibreux.¹⁰¹ GDF-15 (Growth Differentiation Factor-15) est un membre de la superfamille de TGF- β qui a récemment été identifié comme une molécule inhibitrice de l'activation conformationnelle des intégrines exprimées par les neutrophiles, limitant leur adhésion à l'endothélium et leur recrutement au sein du myocarde. La perte de l'effet anti-inflammatoire médié par GDF-15 entraîne une surmortalité nette par rupture cardiaque post-infarctus.¹⁰² D'autres mécanismes anti-inflammatoires ont été décrits au niveau moléculaire, tels que l'expression de récepteurs leurres agissant comme des pièges

à cytokines (decoy receptors), l'activation de voies de signalisation intra-cellulaire inhibitrices comme celle d'IRAK-M (Interleukin Receptor-Associated Protein-M), ou l'uprégulation de protéines matricellulaires en périphérie de la zone infarctée (thrombospondin, osteonectin, osteopontin).^{33,103,104}

3. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE DE TREM-1 AU COURS DE L'INFARCTUS

3.1 ÉCHECS DES THÉRAPEUTIQUES ANTI-INFLAMMATOIRES

Les nombreux résultats expérimentaux très encourageants des thérapeutiques visant à inhiber la réponse inflammatoire dans le myocarde infarcté ont conduit à la réalisation de nombreux essais cliniques, qui se sont révélés soit délétères soit équivoques. Ces stratégies anti-inflammatoires post-infarctus visant à limiter le remodelage ventriculaire ont récemment fait l'objet d'une revue de la littérature par Seropian *et al.*¹⁰⁵ Les molécules ayant fait l'objet d'essais thérapeutiques sont les corticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et des inhibiteurs ciblant la cascade du complément, des molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire, des cytokines pro-inflammatoires variées et les MMPs (figure 8). Par exemple, en 2001, l'étude LIMIT AMI n'a retrouvé aucun bénéfice du traitement par un anticorps anti CD18, inhibant l'adhésion leucocytaire et empêchant donc sa migration vers la zone infarctée.¹⁰⁶ Les mêmes résultats décevants ont été constatés avec l'utilisation d'un anticorps anti CD11b/CD18 (étude HALT MI).¹⁰⁷ L'inhibition du complément n'a également retrouvé aucun effet favorable : trois études cliniques évaluant l'efficacité du Pexelizumab, un anticorps anti C5, se sont avérées négatives, lors d'IDM thrombolysés¹⁰⁸ ou avant angioplastie.^{109,110} Seule l'utilisation d'adénosine s'est révélée bénéfique dans l'étude AMISTAD-II, avec une réduction de la taille de l'infarctus de 11% et une amélioration de la morbidité dans le sous-groupe des patients reperfusés les plus précocement.^{111,112} L'adénosine possède un rôle de modulation de l'inflammation en limitant l'adhésion des polynucléaires neutrophiles à l'endothélium et leur migration dans le myocarde, en diminuant le relargage de cytokines et l'apoptose des cardiomyocytes.¹¹³ L'adénosine est également impliquée dans l'action des lymphocytes T CD4+ lors de la reperfusion.⁹³

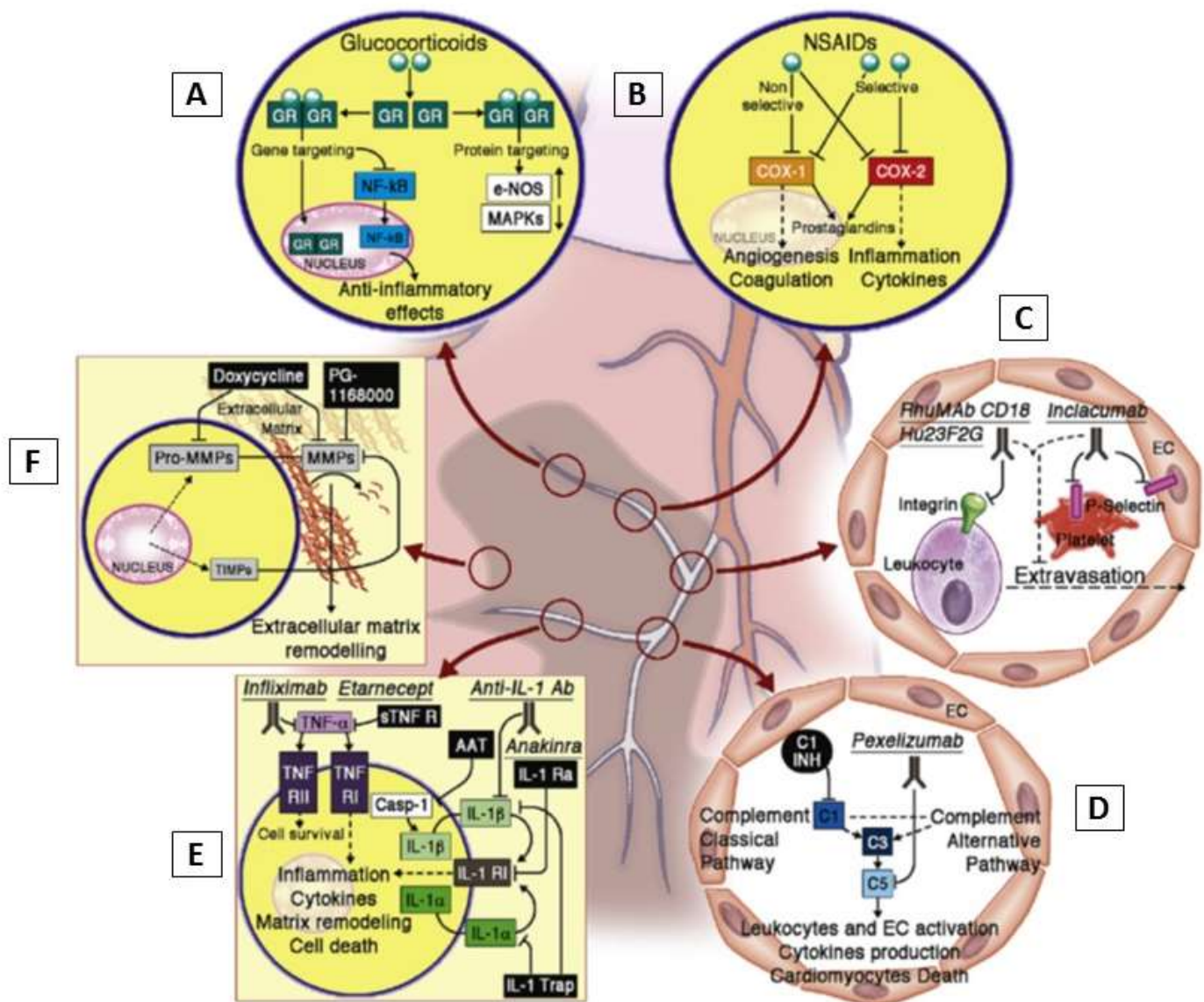


Figure 8 : Les stratégies anti-inflammatoires au cours du remodelage cardiaque après infarctus du myocarde (d'après Seropian *et al*, 2014)¹⁰⁵

De nombreuses stratégies anti-inflammatoires ont été étudiées afin de limiter la réponse immunitaire post-infarctus : A/ corticoïdes ; B/ anti-inflammatoires non stéroïdiens ; C/ inhibiteurs de molécules d'adhésion (intégrines, sélectines) ; D/ inhibiteurs de la cascade du complément ; E/ inhibiteurs de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ; F/ inhibiteurs des MMPs.

La réponse inflammatoire étant indispensable à l'obtention d'une cicatrisation du myocarde lésé, ces résultats décevants ne sont pas totalement surprenants. Comme suggéré par Frangogiannis, une nouvelle approche plus ciblée visant à moduler la réponse immunitaire, en inhibant les processus inflammatoires délabrant, en préservant les processus réparateurs, et en favorisant une transition rapide de la phase inflammatoire vers la phase réparatrice semble nécessaire.¹¹⁴ Ceci est d'ailleurs illustré par le caractère souvent ambivalent de nombreuses voies de signalisation de l'inflammation ou des effecteurs cellulaires de cette réponse immunitaire. Par exemple, la reconnaissance de signaux de danger par les TLR-2 et -4 et l'initiation de la réponse immunitaire qui en dépend au cours de l'infarctus s'avère délétère, tant lors de la reperfusion que lors du remodelage ventriculaire.^{115,116} Cependant, l'activation de ces voies n'est pas uniquement néfaste puisqu'elles sont également impliquées dans le préconditionnement myocardique, c'est-à-dire que leur activation confère une réponse cytoprotectrice à l'ischémie. De la même façon, nous avons discuté précédemment l'implication des monocytes lors de la phase post-infarctus. Or, leur déplétion par administration de clodronate sous forme liposomale au cours de la première semaine (phase inflammatoire) entraîne un défaut de clairance des débris nécrotiques, tandis que leur déplétion plus tardive (phase réparatrice) diminue la formation de tissu fibreux et l'angiogénèse.⁸⁵

Ces exemples apportent une explication à l'échec des thérapies inhibant l'inflammation, et encourage la recherche de voies thérapeutiques permettant une modulation de cette réponse immunitaire en limitant la phase inflammatoire et en favorisant la transition vers la phase de réparation myocardique.

3.2 SIMILITUDES ENTRE L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET LE CHOC SEPTIQUE

Le choc septique est l'illustration la plus caricaturale des conséquences néfastes que peut entraîner le développement d'une réponse inflammatoire dérégulée. De nombreuses inhibitions expérimentales pharmacologiques de la réponse immunitaire innée au cours du choc septique se sont révélées bénéfiques, et ont conduit à la mise en place d'études cliniques de grande ampleur étudiant l'efficacité de molécules anti-inflammatoires, dont certaines ont également été évaluées au cours de l'infarctus du myocarde : corticostéroïdes, anti-TNF α , antagonistes du récepteur à l'interleukine-1.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Aucune efficacité significative n'a pu être démontrée en termes de mortalité. De même, étant donné l'importance de TLR-4 dans la reconnaissance du LPS, des inhibiteurs spécifiques ont été développés, tel l'Entoran, dont les

résultats peu encourageants d'une étude clinique de phase II se sont confirmés lors de l'étude de phase III ACCESS.¹²⁰ L'échec global de telles stratégies chez l'Homme s'explique partiellement par le côté nécessaire et bénéfique de la réponse inflammatoire, que l'agression soit stérile ou infectieuse. Eichacker *et al* ont d'ailleurs retrouvé un bénéfice souvent net de ces thérapeutiques chez les patients avec le plus fort risque de mortalité, à contrebalancer par un effet dangereux de ces mêmes molécules chez ceux présentant un tableau de moindre sévérité clinique.¹²¹ L'inhibition totale de ces médiateurs inflammatoires n'a, semble-t-il, pas d'intérêt thérapeutique aujourd'hui, puisque la réponse immunitaire apparaît, chez un nombre conséquent de patients, soit adaptée, soit préférable à une absence de réponse.

Nous avons vu précédemment que TREM-1 semblait posséder un rôle de senseur pour différents signaux de danger, avec comme résultante l'amplification de la réponse inflammatoire. La modulation pharmacologique de TREM-1 apparaît donc prometteuse en ce sens qu'elle ne s'accompagne pas d'une inhibition complète de la réponse inflammatoire. Des résultats dans le choc septique, certes expérimental, confirment l'efficacité de cette approche.^{17,122} Compte tenu des similitudes précédemment exposées existant entre l'infarctus du myocarde et le sepsis, dans leur composante inflammatoire néfaste, nous avons voulu étudier l'efficacité d'un inhibiteur de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde expérimental.

Publications

1. TREM-1 MEDIATES INFLAMMATORY INJURY AND CARDIAC REMODELING FOLLOWING MYOCARDIAL INFARCTION

Circulation Research.2015;116:1722-1782

Au cours de ce travail, nous avons évalué le rôle de TREM-1 et l'intérêt thérapeutique potentiel de sa modulation avec plusieurs approches expérimentales complémentaires. Tout d'abord, nous avons confirmé l'expression au niveau génique et protéique de TREM-1 au sein du myocarde après infarctus, par le biais d'un modèle murin (souris de souche C57Bl6/J) d'occlusion coronaire permanente par ligature chirurgicale. Nous avons ensuite mis en évidence un bénéfice en termes de survie chez les souris soit traitées par LR12 soit génétiquement invalidées pour le gène *Trem-1*. Cet effet bénéfique s'explique par différents mécanismes :

- diminution du recrutement leucocytaire pro-inflammatoire (essentiellement neutrophiles et monocytes Ly-6C^{high}) sans effet sur le recrutement des populations monocytaires Ly-6C^{low}, évalué par cytométrie en flux,
- diminution de la taille de l'infarctus, de la réaction fibreuse en périphérie de la zone infarctée et de l'apoptose, toutes évaluées par histologie,
- amélioration de la contractilité cardiaque, évaluée par échocardiographie,
- modification du profil cytokinique en faveur d'un environnement moins inflammatoire.
- diminution de l'activité des MMPs, évaluée par zymographie.

Nous avons mis en évidence que l'effet principal de TREM-1 au cours de l'infarctus s'exerce par le biais du recrutement myocardique neutrophilique. En effet, la répétition des expériences après déplétion spécifique en neutrophiles retrouve un profil de recrutement myocardique en monocytes Ly-6C^{high} très diminué par rapport au groupe non déplété en neutrophiles, comparable aux données obtenues après invalidation génétique ou inhibition pharmacologique de TREM-1. La diminution de l'expression de la chimiokine CCL-2 / MCP-1 est un des éléments principaux à l'origine de ces différences d'infiltrat monocyttaire pro-inflammatoire.

Afin d'analyser l'impact de TREM-1 sur la fonction cardiaque *in vivo* après infarctus du myocarde, nous avons utilisé un deuxième modèle expérimental animal. Nous avons réalisé des infarctus par occlusion permanente ou transitoire, ce qui se rapproche plus de la pathologie humaine, chez des rats (souche Wistar). La fonction cardiaque a été évaluée de façon non invasive par PETscanner à J1 et après 6 semaines d'évolution, ainsi que de façon invasive par l'analyse de courbes pression-volume ventriculaires gauches à 6 semaines. L'inhibition pharmacologique par LR12 apporte un bénéfice en termes de contractilité myocardique et limite le remodelage ventriculaire.

Enfin, sTREM-1 est un biomarqueur reflétant l'activation de TREM-1. Nous avons mesuré les taux plasmatiques de sTREM-1 par ELISA chez plus de 1000 patients ayant présenté un infarctus du myocarde, inclus dans la cohorte FAST-MI. Nous avons retrouvé une association forte entre l'élévation plasmatique de sTREM-1 et la survenue d'un décès dans les 2 ans suivant l'infarctus du myocarde.

INTRODUCTION

Acute myocardial ischemia induces an intense activation of the immune system leading to cytokines and chemokines production,^{85,123} and to the recruitment of neutrophils and mononuclear cells in the infarcted area.^{84,92} Early pro-inflammatory signals are crucial in mediating the response to injury, regulating clearance of dead cardiac myocytes and initiating the cellular events necessary for wound healing. However, optimal healing requires activation of inhibitory mechanisms that suppress cytokine and chemokine synthesis and mediate resolution of the inflammatory infiltrate.¹²⁴

Therefore, limiting the inflammatory response amplification appears to be important for containment of injury and optimal infarct healing.

TREM-1 is an immune-receptor expressed by neutrophils, macrophages, and mature monocytes that acts as an amplifier of the innate immune response.¹² It has been shown that blockade of TREM-1 activation by short inhibitory peptides or fusion protein protected from hyper-responsiveness and death in various models of severe infections.^{17,122,125–128} Whether targeting the TREM-1-mediated immune response would be beneficial in acute myocardial infarction is still unknown.

In this study, we examined the role of TREM-1 in orchestrating the inflammatory response that follows myocardial infarction. We show that Trem-1 genetic invalidation or pharmacological inhibition dampens myocardial inflammation, limits leukocytes recruitment, and improves heart function. Moreover, the soluble form of TREM-1 (sTREM-1) is found in the plasma of patients suffering from an acute myocardial infarction and its concentration is an independent predictor of death.

METHODS

Animals. *Trem-1*, *Rag-1* knockout adult male C57BL/6 (6-8 weeks) and wild-type littermates, as well as adult male Wistar rats (Charles River, Lyon, France) were used. *Trem-1*^{-/-} mice have recently been described in details by Weber *et al.*¹²⁷ Experiments were approved by our institutional Animal Care and Use Committee.

Surgical procedures. MI was induced in mice by permanent coronary ligation as described previously.⁹² In brief, mice were anesthetized with Isoflurane (2%/2 liters O₂/min), intubated, and ventilated with an Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilator (Harvard Apparatus). The chest wall was shaved and a left thoracotomy was performed in the fourth left intercostal space. The left ventricle was visualized and the left coronary artery was permanently ligated with monofilament nylon 8–0 sutures (Ethicon) at the site of its emergence from under the left atrium. The chest wall was closed with 7–0 nylon sutures and the skin was closed with 6-0 nylon sutures. A similar procedure was performed for permanent coronary artery ligation in rats. Ischemia-reperfusion model was achieved in rats through a transient (1 hour) coronary artery ligation. The sham-operated control mice underwent the same intervention except that the ligature was left untied.

TREM-1 inhibitory peptide. LR12 (LQEEDAGEYGCM) and LR12-scramble (which is the inactive control peptide) were chemically synthesized (Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands) as COOH terminally amidated peptides. The correct peptides were obtained with >99% yields and were homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed-phase high-performance liquid chromatography. These peptides were free of endotoxin. Animals were blindly randomized 2h after coronary ligation to receive 5mg/kg LR12, or LR12-scramble peptides intra-peritoneally (i.p.) once a day for 5 days.

Histology. Left ventricles were sectioned into transverse slices from apex to base and were embedded in OCT compound (Tissue-Tek) for immunohistochemistry. We stained 5- μ m-thick sections with a rat monoclonal antibody to MPO, CD68, or CD163 (Serotec), or a goat polyclonal antibody to TREM-1 (catalog number AF1278, R&D Systems). We identified PMNs as MPO⁺ cells with a typical multinucleated morphology, and monocytes and macrophages as CD68⁺/CD163⁺ mononucleated cells. We detected MMP9 with a goat antibody to mouse MMP9 (catalog number AF911, R&D Systems). Cardiac healing after

myocardial infarction was assessed at day 1, 14, and 42. Hearts were excised, rinsed in PBS and frozen in liquid nitrogen. Hearts were cut by a cryostat (CM 3050S, Leica) into 7- μ m-thick sections. Masson's trichrome and Sirius red stainings were performed for infarct size and myocardial fibrosis evaluation.

Flow cytometry. To prepare single-cell suspensions from infarcted tissues, hearts were harvested; minced with fine scissors; placed into a cocktail of collagenase I, collagenase XI, DNase I, and hyaluronidase (Sigma-Aldrich); and shaken at 37°C for 1 h. Cells were then triturated and centrifuged (15 min, 500g, 4°C). Spleens were removed, triturated in HBSS at 4°C with the end of a 3-ml syringe, and filtered through 70- μ m nylon filters (BD). The cell suspension was centrifuged at 300g for 10 min at 4°C. Red blood cells were lysed (Red Blood Cells Lysis solution, Miltenyi), and the splenocytes were washed with HBSS and resuspended in HBSS supplemented with 0.2% (wt/vol) BSA. Peripheral blood was drawn via cardiac puncture with citrate solution as anticoagulant, and red blood cells were lysed. Finally, bone-marrow single-cell suspensions were obtained from femurs after flushing them with 1mL HBSS, filtration through 70- μ m nylon filters and centrifugation at 300g for 10 min at 4°C. Total viable cell numbers were determined from aliquots using a hemacytometer with Trypan blue (BioRad).

Cell suspensions were incubated in a cocktail of mAbs against CD4⁺ or CD8⁺ T cells (CD4- or CD8-APC, CD3 ϵ -PE, CD45-FITC), B cells (CD19-PE, CD45-FITC), granulocytes (CD11b-PB, CD45-PerCP, Ly-6G-PE), monocytes subsets (Ly-6C-FITC, F4/80-APC), all antibodies from Miltenyi Biotech. Reported cell numbers were calculated as the product of total living cells (total viable leukocytes per ml) and percentage of cells within selected gate, and reported per mg of tissue (heart), per organ (femur and spleen), or per mL (blood). Data were acquired on FACScalibur cytometer (BD).

Protein phosphorylation analysis. Isolated myocardial cells were lysed in PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, UK) and centrifuged for 5mins at 16,000g at 4°C to collect the supernatant. Protein concentration was determined (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ThermoScientific, Brebières, France). Lysates were then analysed by Western blot (Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12%, BioRad, Marnes-la-Coquette, France, and PVDF membrane, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France), revealed with anti-phospho-p38, anti-pERK1/2, anti-pGSK3 β , anti-iNOS and the corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Cell Signaling, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) and SuperSignal West Femto Substrate (Pierce,

ThermoScientific). Non phosphorylated forms of tubulin (Cell Signaling) were used for normalization. Acquisition and quantitative signal density analyses were performed by a LAS-4000 imager (FSVT, Courbevoie, France) and Multi-Gauge software (LifeScience Fujifilm, France).

RT-qPCR. Total RNAs were extracted from myocardium (infarcted or remote areas) using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified with NanoDrop (ThermoScientific) before being retrotranscribed using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad) and quantified by quantitative PCR using Qiagen available probes (Quantitect Primers) for *Trem-1*, *Il-6*, *Tnf- α* , *Timp1*, *Mmp9*, and *ActB*. *ActB* serves as housekeeping gene. Alternatively, total RNAs were retrotranscribed with RT² First Strand Kit (SABiosciences, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for PCR arrays (Mouse Innate Immune / Endothelial Cells RT² Profiler PCR Arrays, SABiosciences). All PCRs were performed in a MyiQ Thermal Cycler and quantified by iQ5 software (Qiagen). PCR array results were analyzed using PCR Array Data Analysis Software (SABiosciences) and normalized with 5 housekeeping genes.

Cytokine concentration measurements were done by ELISA (mouse Quantikine ELISA kits, R&D Systems) and cytokine panel assays (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, R&D Systems).

In-gel zymography and gelatinase activity assay were performed as previously described.¹⁰²

Echocardiographic measurements. Transthoracic echocardiography was performed in anesthetized mice (isoflurane inhalation) 14 and 42 days after surgery using an echocardiograph (ACUSON S3000, Siemens, AG, Erlangen, Germany) with a 14MHz linear transducer. The investigator (Philippe Bonnin) was blinded to the group assignment. 2D parasternal long-axis views of the left ventricle (LV) were obtained for guided M-mode measurements of the LV internal diameter at end diastole (LVDD) and end systole (LVDS), interventricular septal wall thickness and posterior thickness. Percentage fractional shortening (%FS) was calculated as follows: $\%FS = [(LVDD - LVDS) / LVDD] \times 100$.

FDG-PET imaging. After a metabolic pre-medication by acipimox (50 mg.kg⁻¹), approximately 70 MBq of ¹⁸F-FDG was injected intravenously under a short anesthesia (1.5–2.5% of isoflurane inhalation). Sixty minutes later, a 20-min PET recording was started under continuous anesthesia by isoflurane, using a dedicated small animal PET system (Inveon,

Siemens, Knoxville, TN, USA). The animals were connected to a standard ECG monitor and images were subsequently reconstructed in 16 cardiac intervals, providing a temporal resolution of 11–15 ms for common heart rate values. The axial spatial resolution was less than 1.5 mm. The extent of necrotic myocardium was determined as the % of LV segments showing a < 50% of FDG uptake by using the dedicated QPS software on a 17-segments division of LV. LV ejection fraction, as well as end-systolic and end-diastolic volumes, were determined using the fully automatic QGS software. In these conditions, a precise determination of the actual cavity volumes is provided above the level of 100 μ l corresponding to the lower limit for the LV end-systolic volume in adult rats.

Conductance catheter studies. Rats were anaesthetized with isoflurane and a 2F high-fidelity micro-manometer catheter (SPR-407, Millar Institute, Houston, TX, USA) was inserted into the LV via the right carotid artery. The Millar catheter was connected to a Harvard Data Acquisition System interfaced with a PC with the AcqKnowledge III software (ACQ 3.2).

Clinical study. The population and methods of the French registry of Acute ST-elevation and non-ST-elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) have been described in detail in previous publications.^{129,130} Briefly, all patients ≥ 18 years of age were included in the registry if they had elevated serum markers of myocardial necrosis higher than twice the upper limit of normal for creatine kinase, creatine kinase-MB, or elevated troponins, and either symptoms compatible with acute MI and/ or electrocardiographic changes on at least two contiguous leads with pathologic Q waves and/or persisting ST-elevation or depression. The time from symptom onset to intensive care unit admission had to be <48 h. Patients were managed according to usual practice; treatment was not affected by participation in the registry. Of the 374 centers in France that treated patients with acute MI at that time, 223 (60%) participated in the registry. Among these, 100 centers recruited 1015 patients who contributed to a serum bank. Each patient provided written informed consent. More than 99% of patients were Caucasians. The follow-up was collected through contacts with the patients' physicians, the patients themselves, or their family, and registry offices of their birthplace. The two-year follow-up was >98% complete. The outcome events were assessed blinded to the results of sTREM-1 measurements. The study was reviewed by the Committee for the Protection of Human Subjects in Biomedical Research of Saint Antoine University Hospital and the data file was declared to the Commission Nationale Informatique et Libertés. Plasma concentrations of sTREM-1 were determined in duplicate by ELISA (RnD Systems).

Statistical analysis.

Animal studies: All data, unless indicated, were normally distributed and then are presented as mean $\pm$ SD and statistical significance of differences between groups was analyzed using Student's t test or Kruskal-Wallis test. Kaplan Meier survival curves were analyzed using the Log Rank test. A p value < 0.05 was deemed significant.

Clinical study: An outcome event was defined as all-cause death or non-fatal MI during the 2-year follow-up period. The primary endpoint, a composite of all-cause death and non-fatal MI defined as the episode index at inclusion, and was adjudicated by a committee whose members were unaware of patients' medications, and blood measurements. Continuous variables are described as mean $\pm$ SD and categorical variables as frequencies and percentages. Survival curves according to sTREM-1 tertiles are estimated using the Kaplan–Meier estimator. We used a multivariable Cox proportional hazards model to assess the independent prognostic value of variables with the primary endpoint during the 2-year follow up period. The multivariable model comprised sex, age, previous or current smoking, body mass index, family history of coronary disease, history of hypertension, acute MI, heart failure, renal failure, diabetes, heart rate at admission, Killip class, left ventricular ejection fraction, hospital management (including reperfusion therapy, statins, beta-blockers, clopidogrel, diuretics, digitalis, heparin), and log C-reactive protein levels. The results are expressed as hazard ratios for Cox models with 95% confidence intervals (CIs). All statistical tests were two-sided and performed using the SAS software version 9.1.

RESULTS

Trem-1 inhibition improves heart function after myocardial infarction in mice

In mice, permanent left ventricular ischemia induced Trem-1 expression in the infarcted area (Fig.1a). This expression was transient and observed mainly on infiltrating neutrophils. Trem-1 was also expressed in the human ischemic myocardium (Fig.1b).

We monitored *Trem-1*^{-/-} mice and wild-type (WT) littermates by echocardiography 2 and 6 weeks after left coronary artery ligation (Fig.1c). *Trem-1* genetic invalidation led to an improvement of left ventricular fractional shortening ($p<0.05$). Although there were no differences at day 1, infarct size was significantly reduced by day 14 in *Trem-1*^{-/-} mice and this decrease was still apparent at 6 weeks (Fig.1d). Moreover, cardiac fibrosis as well as the number of apoptotic cells (though we were not able to distinguish which cell type underwent apoptosis) were reduced in *Trem-1*^{-/-} post-ischemic myocardium (Fig.1e). Survival was higher in animals than in *Trem-1*^{+/+} (91% versus 64%, $p=0.008$) (Fig.1f). Cardiac rupture was found to be the cause of death in 62.5% and 25% of WT and *Trem-1*^{-/-} mice respectively ($p<0.02$).

Trem-1 genetic invalidation thus improved heart function and protected from death after MI.

To confirm these findings, we used 2 complementary approaches. TREM-1 activation can be limited by the use of an inhibitory peptide (LR12) that we previously reported to have protective effects during septic shock (8-10). On the opposite, TREM-1 can be engaged by an agonistic monoclonal antibody (Trem-1 mAb) (6). While mAb administration decreased survival, LR12 treatment was associated with a reduced death rate, not different to the one observed in *Trem-1*^{-/-} (Fig.1f). Moreover, LR12 administration also improved cardiac function, reduced infarct size, apoptosis, and fibrosis (Fig.1c-e).

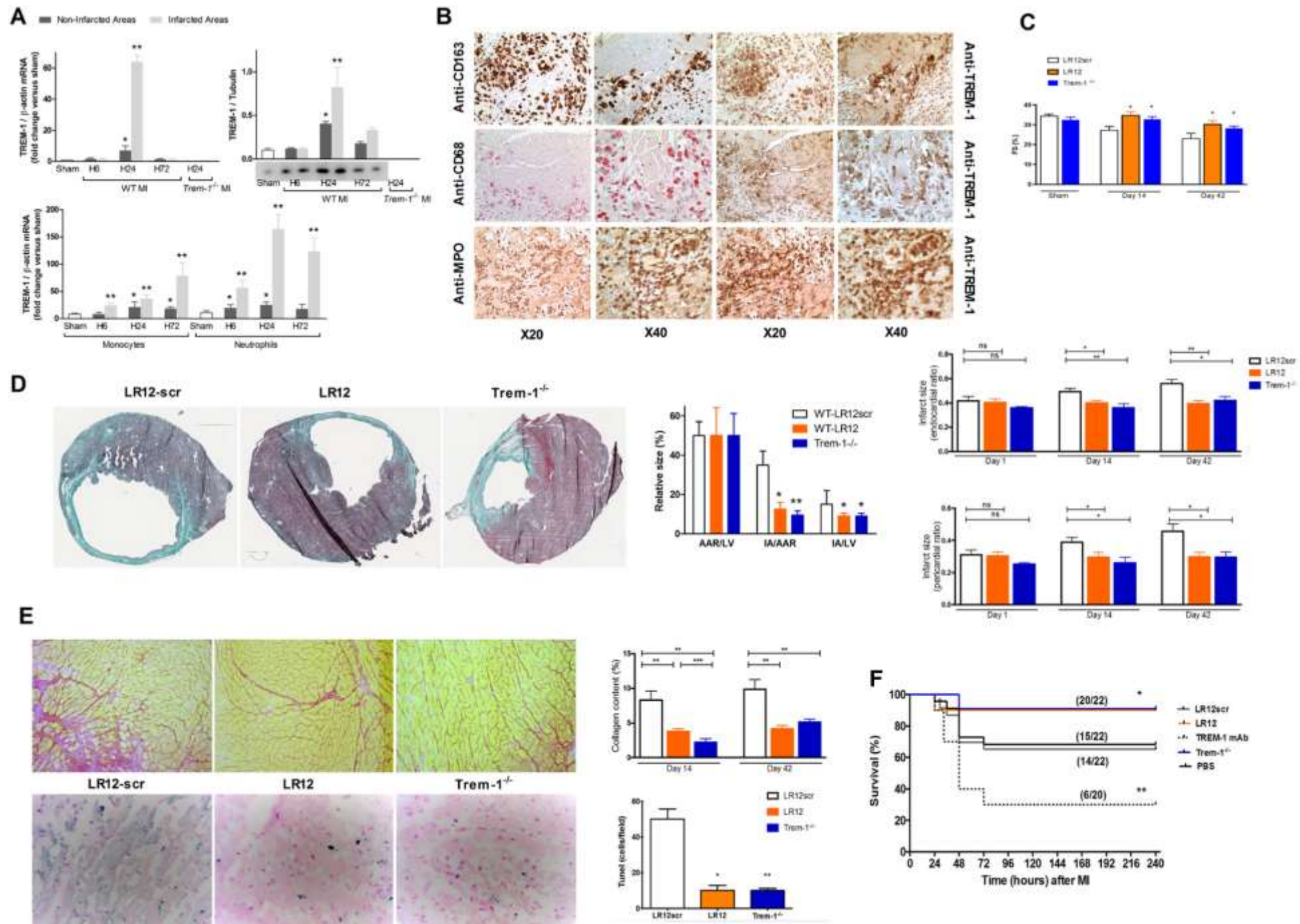


Figure 1: TREM-1 is expressed in the infarcted myocardium and its inhibition improves heart function following myocardial infarction in mice

- (a) Trem-1 mRNA and protein expression levels in infarcted and non-infarcted areas after myocardial infarction (MI) in mice were analyzed by qRT-PCR, Western-Blot and flow-cytometry. Sham mice were analyzed 24 hours after surgery; n=5 at each time point; *p<0.01 versus sham-operated animals; **p<0.001 infarcted versus non infarcted area.
- (b) TREM-1 expression in the heart of patients following acute MI. TREM-1 expression was determined by immunohistochemistry on myocardial apex samples obtained in 5 patients who underwent CABG 48 hours after acute MI. Monocytes/macrophages and neutrophils were stained with anti-CD163, CD68, and MPO respectively. Representative images are presented.
- (c) Echocardiographic analysis after MI in mice. Left ventricular fractional shortening (FS) was measured at baseline, at day 14, and at day 42 after myocardial infarction; n=7-11 mice per group; *p<0.05 versus LR12scr-treated animals.
- (d) Left ventricular (LV) area, the area at risk (AAR), and the infarct area (IA) were measured (TTC staining), and quantitative analysis of infarct size at day 1,14, and 42 was made; n=7-11 per group ; *p<0.02 and **p<0.01 versus LR12scr.
- (e) Cardiac fibrosis was evaluated after Sirius red staining (upper panel) at day14 and 42, and apoptosis was assessed through TUNEL analysis (lower panel) of infarcted areas at day 14; n=4-5 mice per group ; *p<0.02, **p<0.01 versus LR12scr, ***p<0.05 LR12 versus Trem-1^{-/-} mice.
- (f) Kaplan Meier estimate of survival after MI in Trem-1^{-/-}, LR12- or control peptide (LR12scr)-treated and anti-Trem-1 mAb-treated mice (n=20-22 per group). Survival curves are compared using the Log-Rank test. *p=0.008 and **p<0.001 versus LR12scr.

For c-f, WT mice were blindly randomized 2h after coronary ligation to receive LR12, LR12-scramble peptide (to serve as control peptide), Trem-1 mAb (0.2mg/kg), or irrelevant mAb (to serve as control Ab). Treatments were administered intra-peritoneally (i.p.) once a day for 5 days.

Trem-1 controls leukocyte recruitment and activation in infarcted myocardium

As TREM-1 is an amplifier of the innate immune system, we investigated whether its modulation may regulate the inflammatory response. Among the 168 genes involved in innate immunity we examined, the expression of 156 was altered in the myocardium after coronary artery ligation, mostly at 24h after MI. LR12 administration opposed to MI-induced gene activation (Online Table I). Notably, the expression of *Tnf- α* , *Il6*, and *Trem-1* was reduced and the plasma concentrations of the related proteins decreased (Fig.2a) in the LR12 treated group. Administration of LR12 also reduced p38-MAPK and ERK1/2 phosphorylation, decreased the expression of iNOS, and increased the phosphorylation of GSK-3 β (Online Figure I). At 24h after MI, *Mmp9* mRNA expression increased in infarcted areas (Fig.2b). LR12 treatment was associated with increased *Timp-1* and reduced *Mmp9* expressions.

We next examined whether the modulation of inflammation may be explained by a reduction of the number of inflammatory infiltrating cells in the infarcted heart. Using flow cytometry, we analyzed the infiltration of leucocytes within myocardium after coronary ligation. The number of monocytes and macrophages was significantly reduced in *Trem-1*^{-/-} and LR12-treated mice as compared to *Trem-1*^{+/+} (Fig.2c). Trem-1 deletion or pharmacological inhibition almost completely abrogated infiltration of infarcted myocardium by inflammatory Ly-6C^{high} monocytes while had few effects on Ly-6C^{low} recruitment (Fig.2c). Infiltration of neutrophils began very early (6h) in control mice and was also blocked by LR12 treatment as well as in *Trem-1*^{-/-} animals (Fig.2d). This phenomenon has been previously shown in the injured lung.¹²⁸

The effect of *Trem-1* deletion on neutrophils' migration was also observed *in vitro*: neutrophils purified from bone marrow were allowed to transmigrate through a porous filter upon stimulation with plasma obtained from MI animals or ischemic heart lysates. Neutrophils from *Trem-1*^{-/-} had a reduced migration compared to WT cells. Lipopolysaccharide-induced neutrophil activation was also decreased in the absence of *Trem-1* (Online Figure II).

Although not expressed by lymphocytes, TREM-1 influenced B- and T-cells mobilization: B- and CD8⁺-lymphocyte infiltration was reduced, while CD4⁺-cells recruitment was unchanged in LR12-treated and knock-out mice (Online Figure III).

TREM-1 modulation thus limits leukocytes recruitment to the ischemic myocardium.

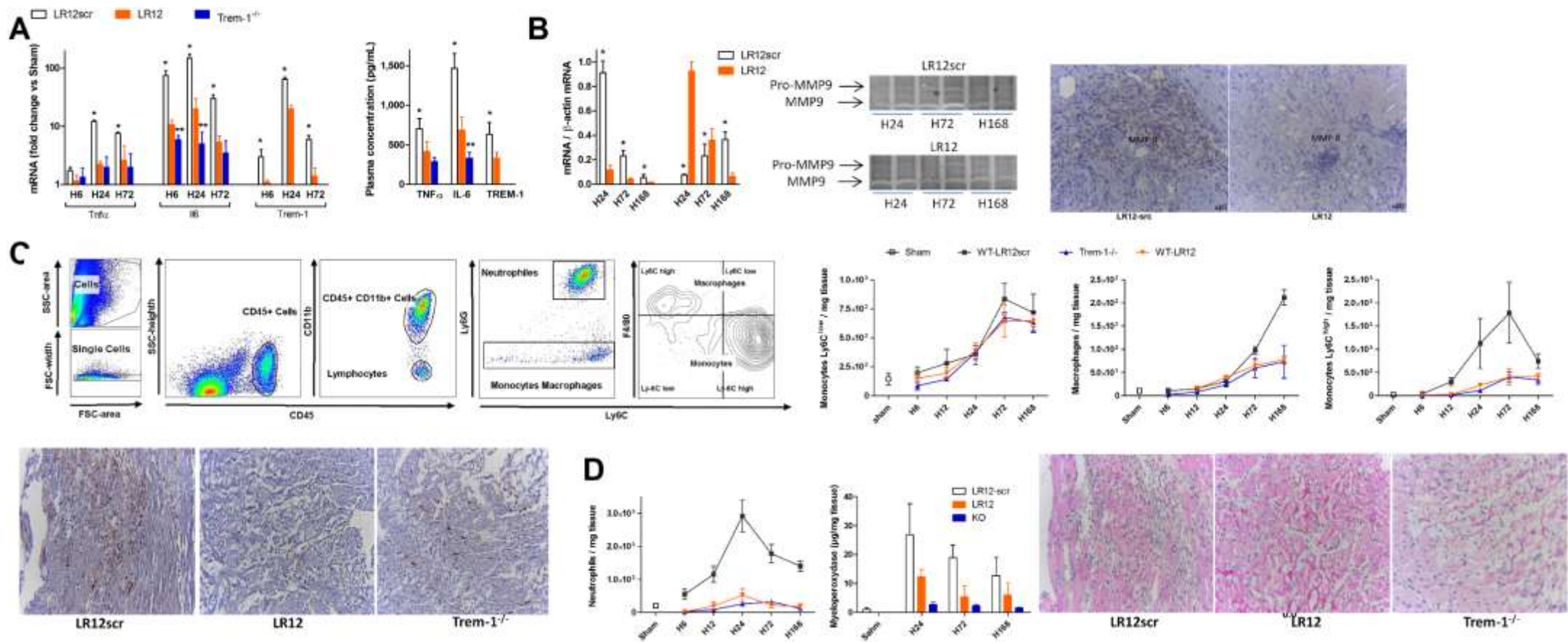


Figure 2 : Trem-1 controls leukocytes recruitment and activation in the infarcted myocardium

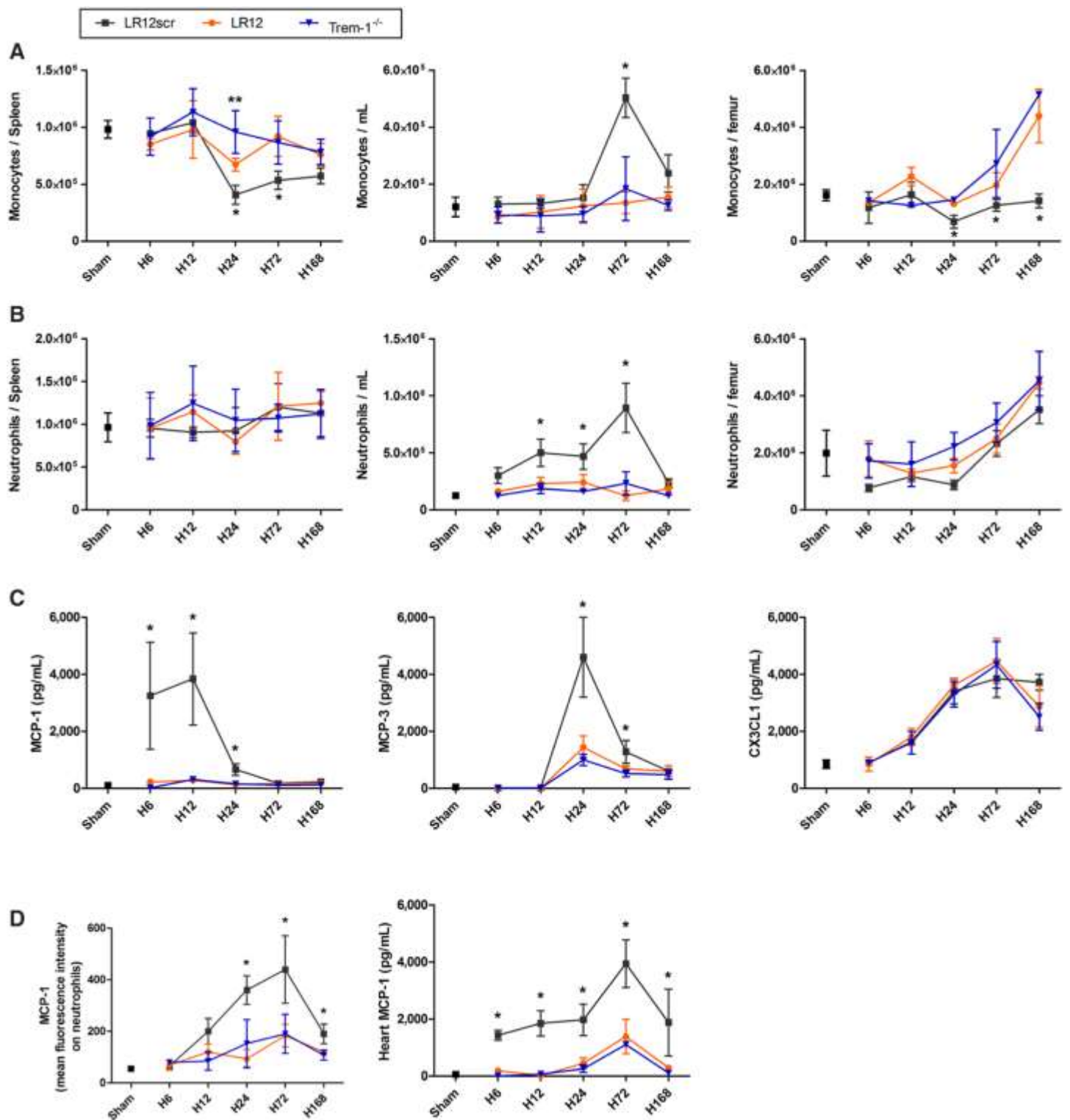
- Quantification of *Tnf-α*, *Il6* and *Trem-1* gene expression in the infarcted myocardium at various time points after MI (left) and the plasma concentrations of the corresponding proteins (right) at 24 hours; n=5-7 per points; *p<0.01 LR12scr versus other groups, **p=0.008 Trem-1^{-/-} versus LR12.
- Quantification of myocardial *Timp1* and *Mmp9* gene expression at several time points after MI in WT mice treated with LR12 or LR12scr (right); in-gel zymography of the infarcted area at various time points after MI (middle), and representative immunohistochemistry tissue sections of infarcted areas 24 hours after MI illustrating *Mmp9* expression (Left); n=5 per group and per time point, *p< 0.01 versus LR12.
- Flow-cytometric gating strategy and quantification of monocytes and macrophages, with representative immunohistochemistry of infarcted areas 24 hours after MI.
- Flow-cytometric quantification of neutrophils infiltration of the infarcted myocardium and myocardial concentration of myeloperoxidase; and representative tissue sections of ischemic heart 24 hours after MI illustrating neutrophils infiltration. For these experiments (c&d), n=7-10 mice per group and per time point; *p< 0.01, **p<0.001 versus LR12scr.

Trem-1 regulates leukocytes mobilization from remote compartments

Following coronary ligation in control animals, as previously reported, we observed a decrease of BM- and spleen-derived monocytes number at 24h followed by a pronounced increase of circulating monocytes number at 72h, (Fig.3a). Interestingly, Trem-1 genetic deletion or pharmacological modulation induced an accumulation of monocytes in the spleen and in the bone marrow at 24h and a reduction in the blood at H72 suggesting that blocking Trem-1 reduced monocytes mobilization.

Peripheral blood neutrophils count was increased 6h after MI. This neutrophilia was not observed in *Trem-1*^{-/-} or LR12-treated mice (Fig.3b). Number of circulating B lymphocytes increased by 72h after MI, while CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes count did not change significantly. Blocking Trem-1 prevented in part from this B lymphocytes kinetics patterns (Online Figure IV).

To explain the defect of leukocytes mobilization induced by Trem-1 inhibition, we next focused on chemokines. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1 or Ccl2), Cx3cl1 (or Fractalkine), and Mep-3 (or Ccl7) are important chemokines involved in the recruitment of respectively Ly-6C^{high}, Ly-6C^{low} monocytes, and lymphocytes to inflammatory sites. Plasma and heart concentrations of Ccl-2 increased very early (6h), while plasma levels of Ccl-7 and Cx3cl1 increased later (24h) following MI. Ccl-2 and Ccl-7 levels were reduced while Cx3cl1 concentration did not change in *Trem-1*^{-/-} and LR12-treated mice (Fig.3c). Ccl-2 production by myocardial neutrophils was decreased in *Trem-1*^{-/-} and LR12-treated mice (Fig.3d).



Following MI, neutrophils infiltrate the ischemic myocardium several hours before monocytes (Fig.2c-d). We therefore hypothesized that neutrophils may be responsible for Ccl-2 production that will subsequently attract inflammatory monocytes to the heart. We achieved to efficiently deplete neutrophils in mice by the administration of 1A8 antibody (Fig.4a). In neutrophils depleted animals, plasma concentration of Ccl-2 was decreased and barely detectable in the ischemic myocardium (Fig.4b). These data suggest that neutrophils are an important cellular source of Ccl-2 in the heart, although we cannot completely exclude a release by another cell type.

Consequently, we observed that neutrophils depletion associated with a reduction of monocytes infiltration in the heart (Fig.4c). Administration of LR12 to 1A8 treated mice did not yield to additional effects on cellular infiltration (not shown) though further reduced the cardiac inflammatory response (Fig.4d).

Finally, to rule out an action of LR12 on lymphocytes, which was highly improbable due to an absence of Trem-1 expression on these cells, we performed experiments using *Rag-I*^{-/-} animals. In the absence of lymphocytes, LR12 was still able to prevent myocardial neutrophil infiltration and activation (not shown).

Taken together, these data show that following MI, Trem-1 inhibition decreases neutrophil recruitment and activation, which in turn yields to a reduced monocyte mobilization from remote compartment.

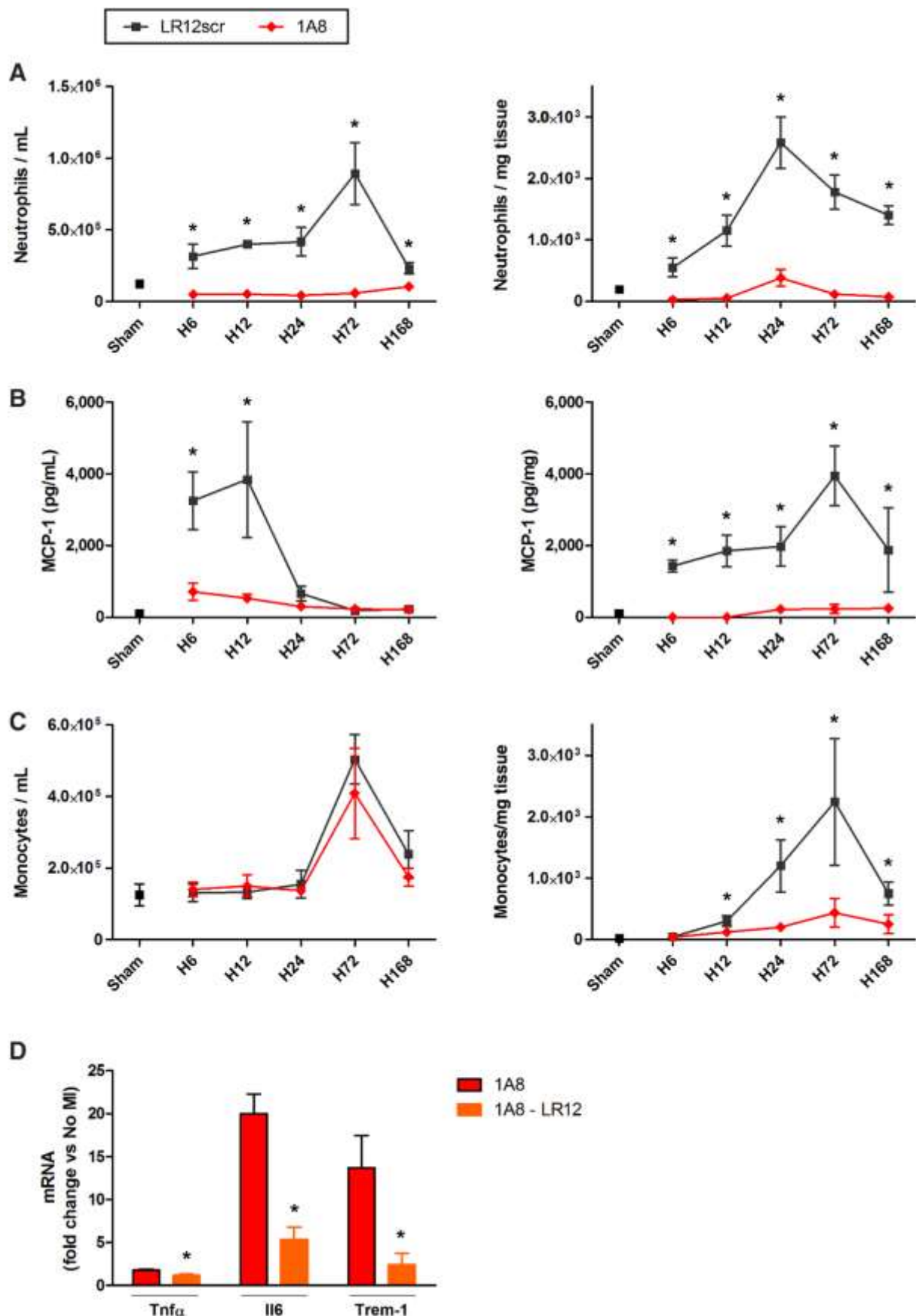


Figure 4: Neutrophils are the main cellular target of the TREM-1 modulation

- (a) Flow-cytometric quantification of blood and heart neutrophils at different time points in MI mice depleted on neutrophils by 1A8 antibody
- (b) Measurement of Ccl-2 concentrations in the plasma and the heart.
- For (a) and (b), n=4-5 mice per group and per time point; *p<0.05 versus 1A8 animals.
- (c) Flow-cytometric quantification of blood and heart monocytes at different time points in MI mice depleted on neutrophils by 1A8 antibody. n=4-5 mice per group and per time point; *p<0.05 versus 1A8 animals.
- (d) Quantification of *Tnf-α*, *Il6* and *Trem-1* gene expression in the infarcted myocardium at 24 hours after MI in neutrophils depleted mice; n=4-5 per points; *p<0.01 1A8-LR12 versus 1A8.

Trem-1 modulation improves cardiac function after myocardial infarction in rats

To further extend functional analyses we moved to a rat model of MI. Within 1 hour after permanent coronary artery ligation, rats were imaged by Positron Emission Tomography with 18F-fluorodesoxyglucose (FDG-PET) in order to determine infarct extension and ventricular volumes, and then blindly randomized to receive daily i.p. injection for 5 days of LR12 or the control peptide (LR12scr). Six weeks after MI, rats were again subjected to FDG-PET imaging (Online Figure V) and invasive hemodynamics studies by using a left ventricular conductance catheter. The 2 groups of animals were similar at baseline. Six weeks after MI a severe left ventricular dilation had occurred in the control animals: this pathologic ventricular remodeling was partly prevented by LR12 (Table). Invasive hemodynamics data were available for 12 out of 18 LR12scr and 12 out of 17 LR12-treated animals due to ventricular arrhythmias in the remaining rats. Main load-independent systolic and diastolic myocardial function parameters were improved by LR12 treatment (Online Figure VI). Similar results were obtained in an ischemia-reperfusion model (Online Figure VII).

TREM-1 modulation thus prevented from ventricular remodeling and systolo-diastolic dysfunction after a myocardial infarction in rats.

Table. Evaluation of Heart Function by FDG-PET in Rats at Day 1 and 6 Weeks After a MI

	Sham (n=7)	LR12scr (n=18)	LR12 (n=17)	PValue
PET-scan on Day 1				
Weight, g	327±6	303±42	313±51	0.32
SAP, mm Hg	117±14	134±15	136±17	0.76
HR, bpm	404±14	378±39	400±26	0.07
MI area, %LV	0	23±9	22±11	0.88
MI area, mm ²	0	57±27	54±30	0.88
EDV, µL	370±32	421±75	417±92	0.30
ESV, µL	139±32	223±51	215±62	0.23
PET-scan on Day 42				
Weight, g		447±28	426±49	0.26
Δ PET-scan n°1		144±44	113±51	0.053
SAP, mm Hg		135±15	136±17	0.76
Δ PET-scan n°1		-1±23	-0±26	0.37
HR, bpm		370±43	387±25	0.12
Δ PET-scan n°1		-8±31	-13±22	0.91
MI area, %VG		15±9	16±11	0.81
Δ PET-scan n°1		-8±6	-6±8	0.11
MI area, mm ²		48±29	49±40	0.81
Δ PET-scan n°1		-9±20	-5±23	0.11
EDV, µL		694±100	611±167	0.05
Δ PET-scan n°1		273±77	194±95	0.007
ESV, µL		354±85	311±135	0.08
Δ PET-scan n°1		131±60	96±80	0.062

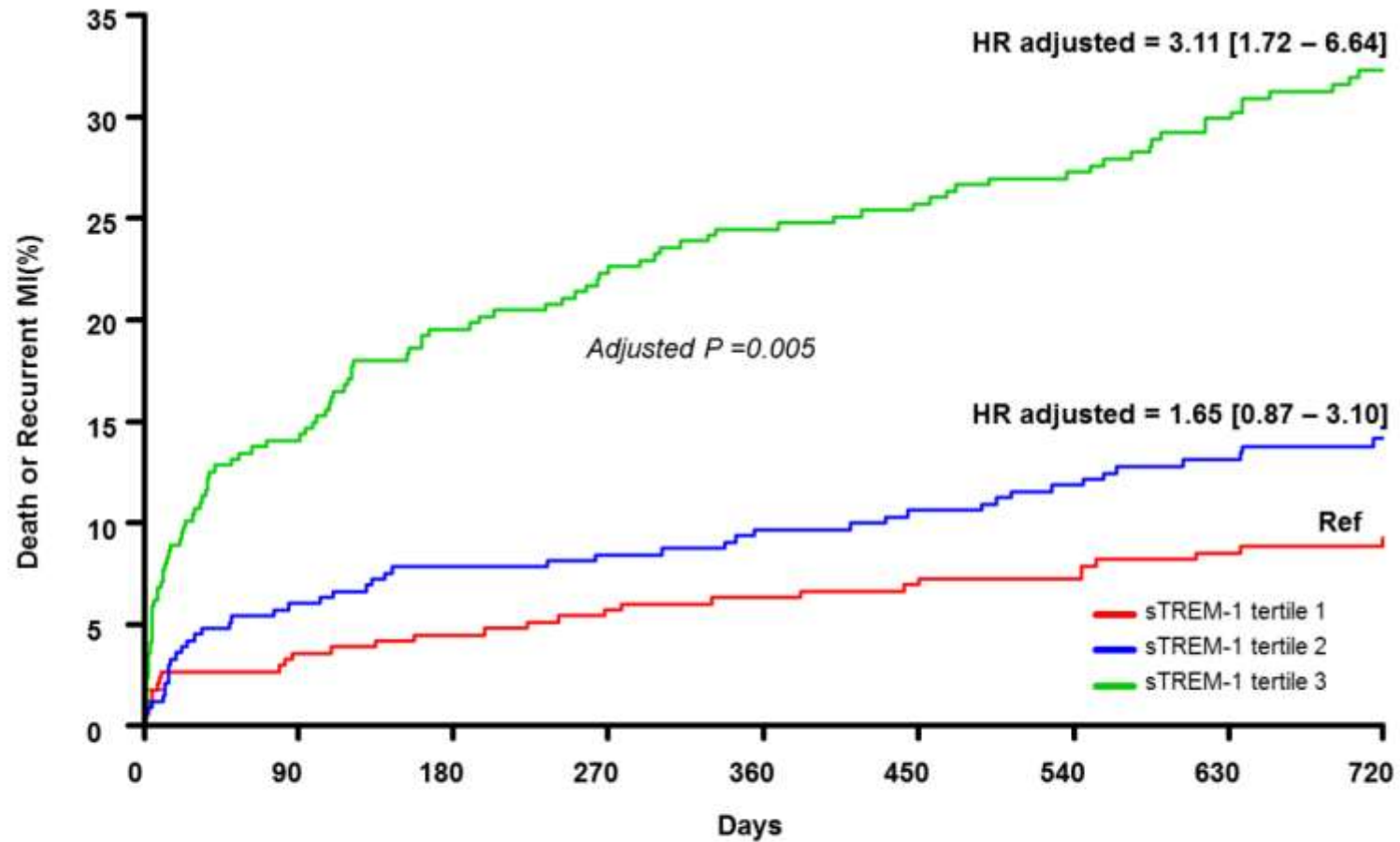
P values are for comparisons of LR12scr and LR12 groups. EDV indicates end diastolic volume; ESV, end systolic volume; FDG-PET, fluorodeoxyglucose-positron emission tomography; HR, heart rate; MI, myocardial infarction; and SAP, systolic arterial pressure.

Plasma concentration of soluble TREM-1 in patients with acute coronary disease

TREM-1 activation may be assessed through the measurement of its soluble form (sTREM-1) in plasma. We addressed the relevance of our experimental findings to the human disease by evaluating the relationship between circulating sTREM-1 plasma concentrations and survival in a cohort of 1015 patients enrolled in the prospective, multicenter French registry of Acute ST elevation, or non-ST elevation Myocardial Infarction (Fast-MI, NCT00673036). Of the 1015 patients enrolled, 154 patients (15%) died during the 2-year follow-up period. We found that increased concentrations of sTREM-1 at the time of admission in patients with acute MI was related to higher risk of death after 2 years of follow up, even after adjustment for several multivariable risk factors including age, sex, body mass index, diabetes, smoking status, hypertension, previous history of MI, stroke, chronic heart or renal failure, left ventricular ejection fraction, hospital management including reperfusion therapy, recommended drug therapies including statins, and C reactive protein. The adjusted HR of death associated with an increase of 1 pg/mL of sTREM-1 was 2.22 (CI 95%=1.69-2.93, $p < 0.0001$), 2.29 (CI 95%=1.71-3.06, $p < 0.0001$) with CK added in the model, and 2.18 (CI 95%=1.61-2.94, $p < 0.0001$) with TnI.

There were no correlations between sTREM-1 and CK ($R=0.018$, $p=0.57$) or between sTREM-1 and TnI ($R=0.012$, $p=0.72$).

The probability of outcome events as a function of the baseline tertile levels of sTREM-1 is presented in Figure 5. After adjustment with the same variables as above, sTREM-1 plasma concentration remained an independent correlate of the risk of death at 2 years (HR adjusted at 1.65 (0.87–3.10) and 3.11(1.72–6.64) for tertile 2 and tertile 3 respectively compared with tertile 1, chosen as a reference, $p < 0.0001$).



No.at Risk

sTREM-1 tertile 1	339	319	314	306	302	298	295	282	238
sTREM-1 tertile 2	337	310	304	296	292	288	283	258	234
sTREM-1 tertile 3	339	281	263	251	243	237	232	206	176

Figure 5 : Plasma concentration of Soluble TREM-1 predicts death at 2 years following myocardial infarction in humans

Survival curves according to plasma concentration of soluble TREM-1 (sTREM-1) in patients suffering from acute MI. Survival estimates are compared using Log-Rank test.

DISCUSSION

Considerable work has been done to decipher cellular or molecular targets that may be addressed in MI clinical trials, though with disappointing results.^{107,110,131} Here we used several complementary animal models as well as patients' samples to demonstrate the role of TREM-1 in orchestrating the inflammatory response triggered by MI. Genetic invalidation or pharmacological blockade of Trem-1 inhibits the recruitment of inflammatory cells to the infarcted myocardium and their activation. This translates into a reduction of infarct size and an improvement of cardiac function and survival. Using a nationwide cohort of patients admitted for an acute MI we observed that soluble TREM-1 plasma concentration (a marker of TREM-1 activation) at admission is a strong predictive factor of death during a 2-year follow-up.

A crucial determinant of infarct healing and scar formation resides into the delicate balance between the type and amount of recruited leukocytes.⁸⁴ Very rapidly after ischemia, neutrophils accumulate in the injured myocardium and such an extravasation, when excessive, is thought to be deleterious. Trem-1 inhibition almost completely abrogated myocardial infiltration with neutrophils. Such a phenomenon has recently been described during pneumonia in which Trem-1 inhibition blocked transepithelial migration of neutrophils.¹²⁸ Shortly after neutrophils, inflammatory Ly-6C^{high} monocytes are recruited that, if left unchecked may cause infarct expansion and ventricular remodeling. This inflammatory subset is progressively replaced by reparative Ly-6C^{low} monocytes that promote inflammation resolution and extracellular matrix reorganization.⁸⁵ The spleen is an important reservoir for monocytes during MI.⁸⁶ We here observed that Trem-1 is important in mediating not only splenic monocytes exit but also mobilization from the bone marrow and myocardial infiltration. Moreover, although Trem-1 inhibition decreases Ccl-2 production and thus prevents from the accumulation of Ly-6C^{high} cells, it does not compromise Ly-6C^{low} monocytes recruitment triggered by Cx3cl1. Lymphocytes are also present, though in low numbers, in the infarcted area and rapidly proliferate after MI. The exact role of lymphocyte subsets is not clear but recent evidences suggest a deleterious effect of B cells, whereas CD4⁺ T cells probably facilitate wound healing and transition from Ly-6C^{high} to Ly-6C^{low} monocytes.^{92,94} Again, Trem-1 seems important in mediating lymphocyte recruitment, especially cytotoxic CD8⁺ and B cells. By contrast, Trem-1 inhibition does not alter CD4⁺ recruitment. Although the precise mechanisms remain to be elucidated, all these data suggest

that Trem-1 plays an important role in the recruitment of leukocytes, both quantitatively and qualitatively.

Trem-1 is an amplifier of the immune response during various inflammatory diseases.¹² We show that the same holds true following MI: Trem-1 inhibition dampens inflammatory gene and protein activation, and decreases cytokine/chemokine production. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces the risk of fatal cardiac rupture and ventricular remodeling after MI. Myeloid cells, especially neutrophils, are a major source of Mmp9 in the infarcted myocardium.¹⁰² Trem-1 inhibition, in decreasing myeloid cells infiltration, reduces Mmp9 expression and activity, while improves Timp1 expression. This yields to an overall matrix metalloproteinase activity reduction in the injured myocardium and thus may prevent from remodeling.

Besides improving immediate survival, the aims of the treatment of myocardial infarction are to avoid its major late-onset consequence, the development of chronic heart failure. We therefore studied the consequences of Trem-1 modulation following a myocardial infarction in rats using two complementary techniques: microTEP imaging and invasive hemodynamic study. Six weeks after the onset of a permanent myocardial ischemia, left ventricular function remains compromised and important ventricular remodeling had occurred. A short treatment (for the first 5 days) of animals with a Trem-1 inhibitor opposes to this ventricular dilation and improves systolic and diastolic ventricular functions. We also confirmed this heart function improvement during myocardial ischemia-reperfusion.

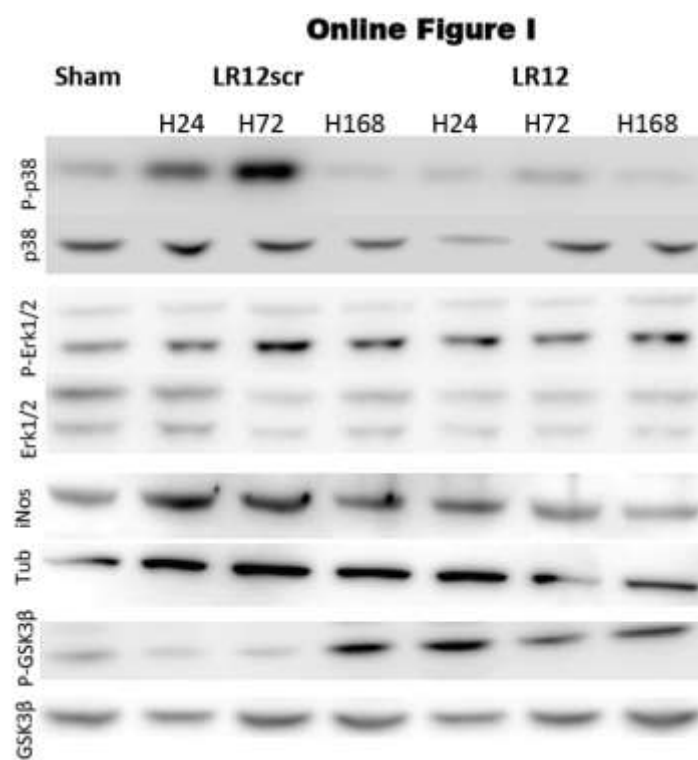
Considering that inhibition of Trem-1 only occurs during the first 5 days following MI (the LR12 half-life is very short),¹⁷ we thus speculate that the initial modulation of the inflammatory response must be responsible for this late-onset ventricular function improvement.

Questions often arise regarding the translation of animal findings into human pathology.¹²⁴ To decipher whether TREM-1 could also play a role in humans, we measured its soluble form in the plasma of patients suffering from acute MI. Using a nationwide cohort of patients admitted for an acute MI we observed that soluble TREM-1 plasma concentration at admission is linked to the risk of death during the 2 years of follow-up. Importantly, sTREM-1 concentration remains predictive even after adjustment for all parameters known to impact outcome including therapeutic management such as reperfusion therapy and

recommended medical drugs. TREM-1 thus also appears to be an important mediator during MI in patients.

In conclusion, our results indicate that TREM-1 has a major role in controlling inflammatory cells recruitment and activation following myocardial infarction. TREM-1 modulation is able to prevent from ventricular dysfunction. Finally, TREM-1 activation is an independent outcome predictor of death in patients following an acute MI. The ability to manipulate TREM-1 activity to achieve therapeutic effects seems promising and needs to be further explored with the goal to finally reduce the epidemic development of post-infarction chronic heart failure.

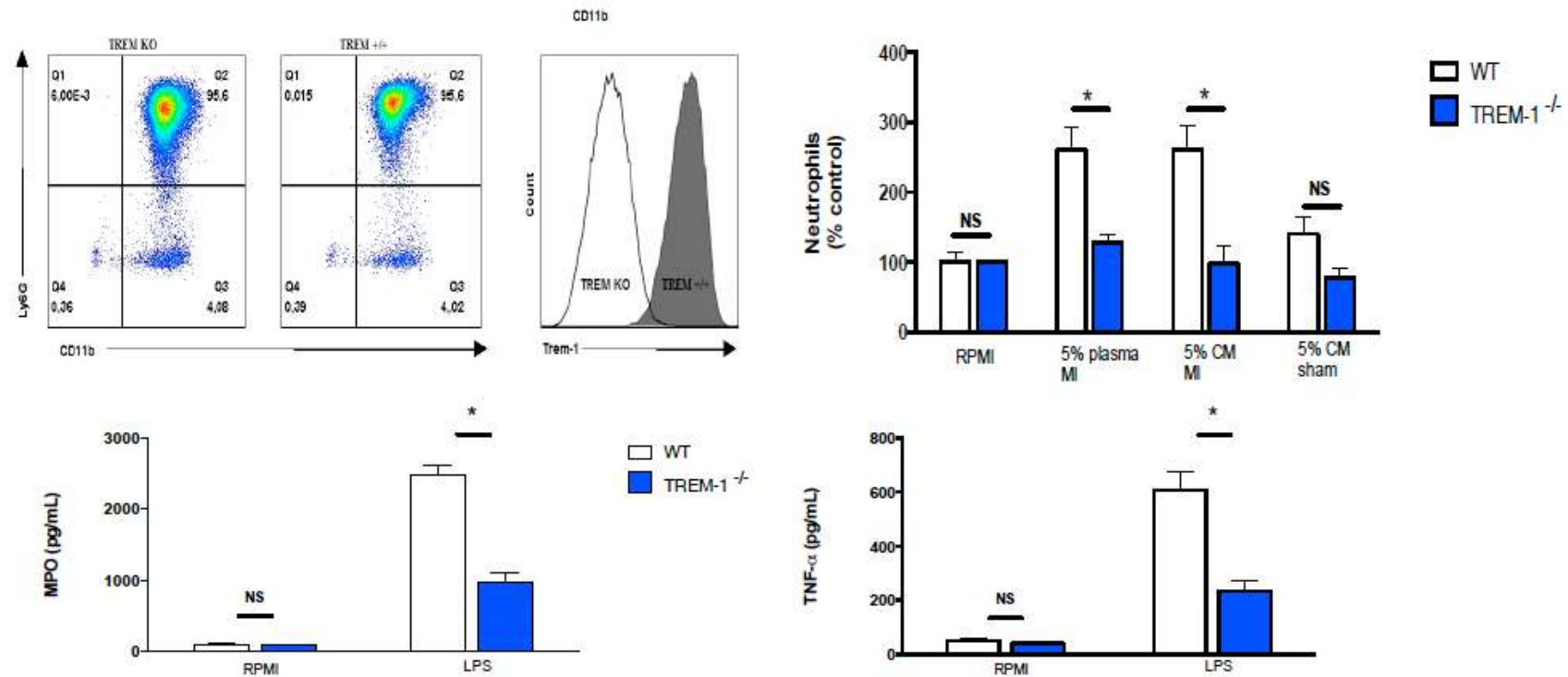
SUPPLEMENTAL MATERIAL



Protein expression / phosphorylation in the infarcted myocardium

Protein expression / phosphorylation assessed by western blot in infarcted myocardium at various time points in WT mice treated with LR12 or LR12scr

Online Figure II



TREM-1 controls neutrophils migration and activation

Neutrophils were isolated from *Trem-1*^{-/-} and WT littermate bone marrow using negative immunomagnetic enrichment technique on autoMACS columns (neutrophils isolation kit, Miltenyi Biotec). Purity was checked by flow cytometry before transmigration or stimulation assay.

Upper panel: 24-wells plate and cell culture inserts (Millicell-PCF, Millipore) with porous polycarbonate filters (8μm pore size) were coated with rat-tail type I collagen (BD Biosciences) (60μg ml⁻¹) for 45 min at 37°C and then blocked with 3% (wt/vol) BSA in PBS for 1 h at 37°C. 300 μl of medium were added to the lower compartment. Various conditions were used: (1) control medium (RPMI -10% (vol/vol) FBS) only or with (2) 5% vol/vol plasma from mice 6 hours after MI, (3) 5% vol/vol sham heart supernatant (HS) or (4) 5% vol/vol ischemic heart supernatant.

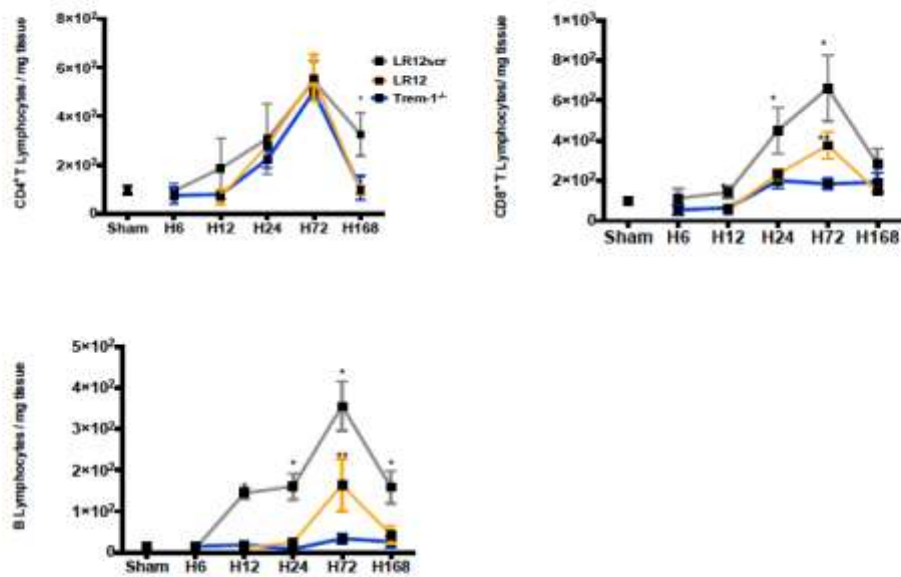
Heart supernatants were obtained as follows: 6 hours after MI or sham surgery, hearts were collected, minced, placed in RPMI (200 mg of heart tissue per ml) and incubated for 2 h at 37°C. After incubation, samples were centrifuged (10 min, 400 G, 4°C) and medium was collected.

5 × 10⁵ neutrophils in 200 μl of control medium were added to the upper compartment of cell culture insert. Neutrophils were allowed to migrate for 3 h at 37°C.

Lower panel: Alternatively, isolated neutrophils were stimulated or not with lipopolysaccharide (100ng/mL LPS, O111:B7, Sigma-Aldrich) for 2 hours and supernatants analyzed by ELISA for myeloperoxidase and TNF-α concentrations.

*p<0.05 WT vs Ko.

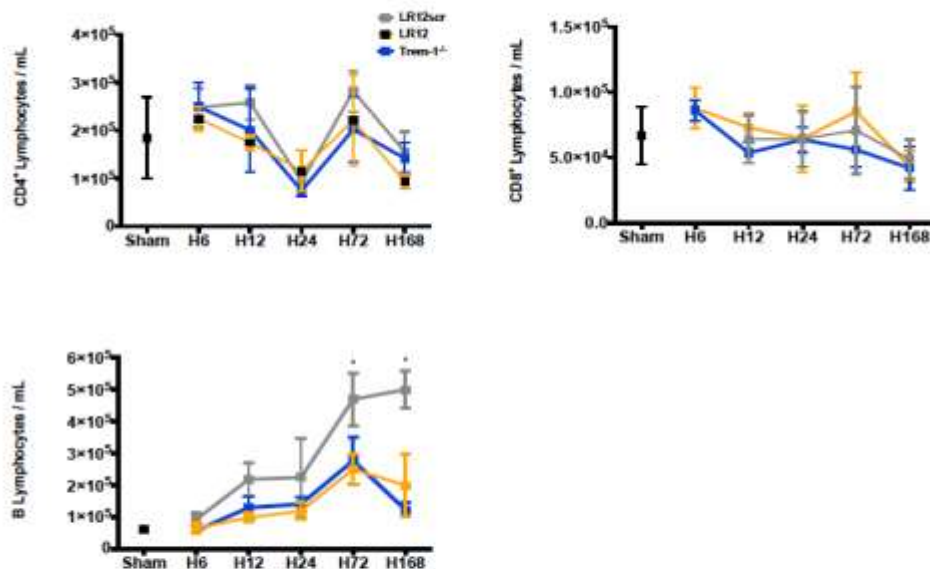
Online Figure III



Trem-1 controls lymphocytes recruitment to the infarcted myocardium

Flow-cytometric quantification of lymphocytes in the infarcted myocardium at different time points in Trem-1^{-/-} or WT mice treated with LR12 or the control peptide (LR12scr); n=7-10 mice per group and per time point; *p<0.05 LR12scr versus other groups, **p<0.05 LR12 versus Trem-1^{-/-}

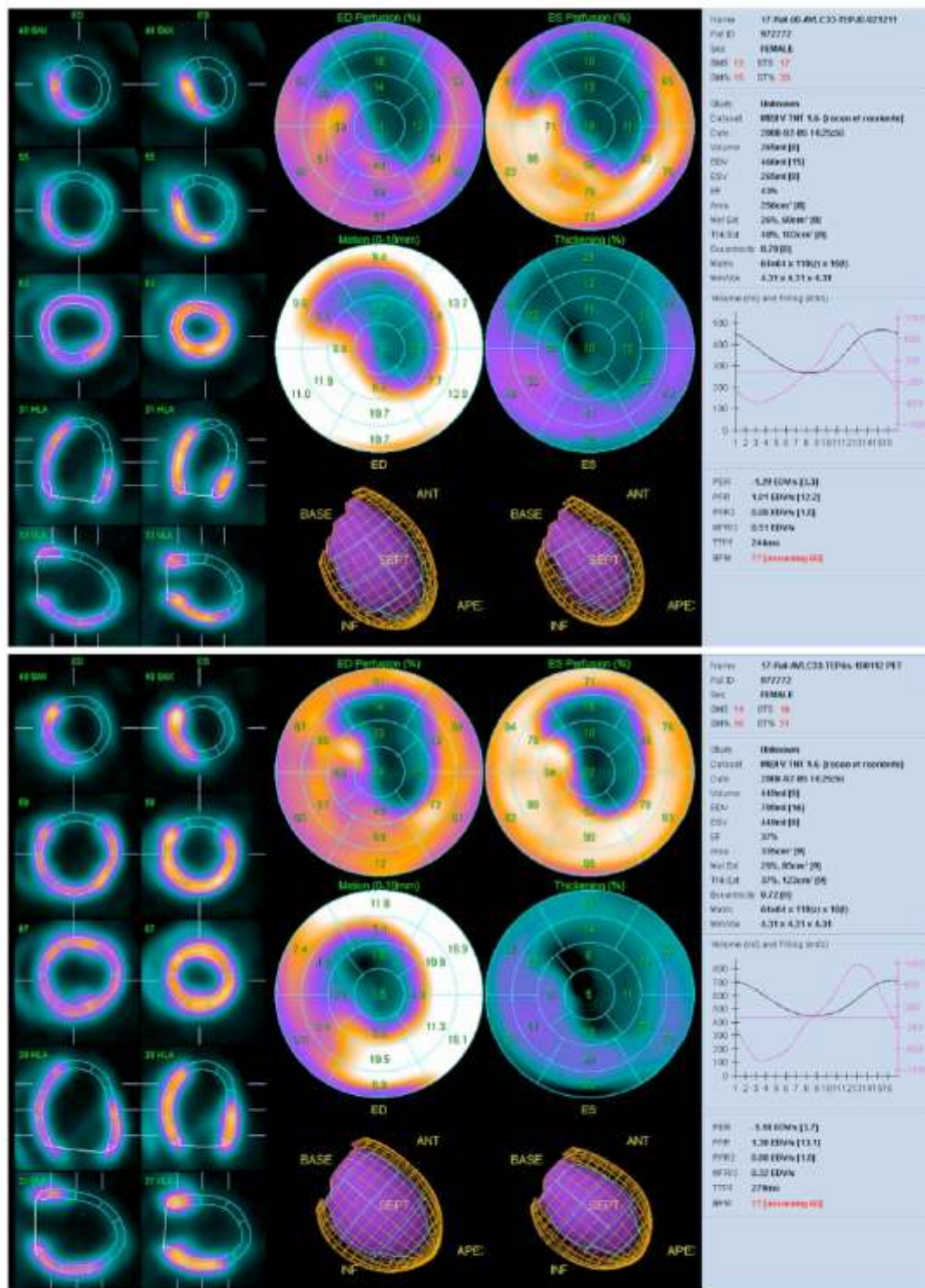
Online Figure IV



Trem-1 alters blood lymphocytes count after MI

Flow-cytometric quantification of blood lymphocytes at different time points in Trem-1^{-/-} or WT mice treated with LR12 or the control peptide (LR12scr); n=7-10 mice per group and per time point; *p<0.05 LR12scr versus other groups

Online Figure V



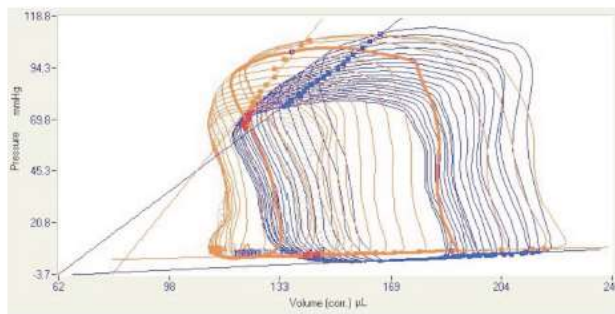
PET examinations of a control rat that underwent a permanent coronary ligation.

Upper panel : PET obtained on the day of MI. A perfusion defect of anteromedial, anterodistal, lateral, and apical segments is present, along with motion and thickening alterations. EDV=466 μ L, ESV=265 μ L, EF=43%, eccentricity index=0.78 (normal value=1).

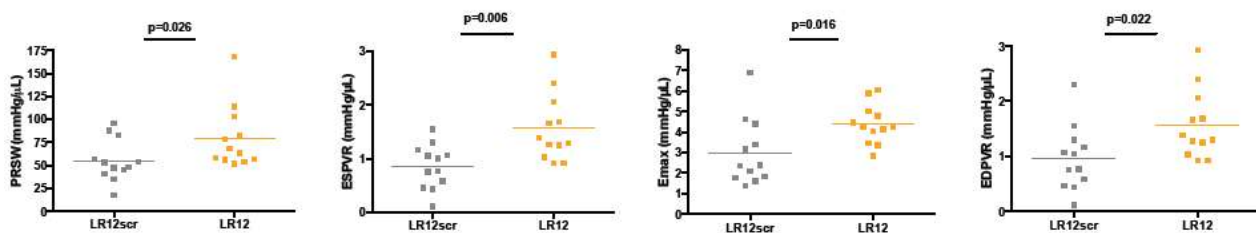
Lower panel: The same rat was imaged at 6 weeks after MI. An important ventricular remodelling had developed as objectified by increased volumes (EDV=709 μ L and ESV=449 μ L) and decreased excentricity index (0.72).

Online Figure VI

A



B

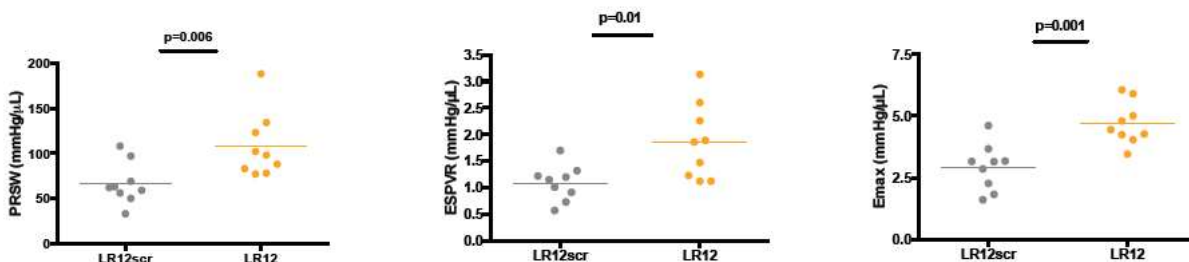


Assessment of heart function by conductance catheter 6 weeks after a permanent myocardial ischemia in rats

a) Representative illustration of heart pressure-volume relationship in a control (LR12scr- treated) (in blue) and LR12-treated rat (in orange). The slope of the line linking end-systolic points corresponds to the load-independent systolic parameter E_{max} . In this example, E_{max} = 2.46 mmHg/ μ L in control animal and 6.85 mmHg/ μ L in LR12-treated rat.

b) Main load-independent systolic (end systolic pressure volume relationship: ESPVR, preload recruitable stroke work: PRSW, maximal elastance: E_{max}) and diastolic (end diastolic pressure volume relationship: EDPVR) myocardial function parameters were measured 6 weeks after MI in rats by conductance catheter.

Online Figure VII



Assessment of heart function by conductance catheter 6 weeks after a transient myocardial ischemia in rats

Main load-independent systolic (end systolic pressure volume relationship: ESPVR, preload recruitable stroke work: PRSW, maximal elastance: E_{max}) myocardial function parameters were measured 6 weeks after a transient (1 hour) myocardial ischemia in rats by conductance catheter.

Online table 1 : myocardial gene expression in LR12scr and LR12-treated mice

Gene Symbol	2 ^{-ΔCt} (H6)		p-value	Fold variation	2 ^{-ΔCt} (H24)		p-value	Fold variation	2 ^{-ΔCt} (H72)		p-value	Fold variation
	LR12scr	LR12			LR12scr	LR12			LR12scr	LR12		
Ace	1.26E-01	1.05E-01		-1.19	5.95E-02	1.36E-01		2.29	9.57E-02	4.48E-02		-2.14
Adam17	6.12E-02	8.50E-02		1.39	6.35E-02	4.84E-02		-1.31	4.89E-02	6.69E-02		1.37
Adora2a	1.98E-02	8.39E-02		4.24	1.38E-02	1.15E-02		-1.21	1.04E-02	8.83E-03	<0.001	-1.17
Angpt1	5.28E-02	4.66E-02		-1.13	1.01E-02	7.05E-03	<0.001	-1.43	1.06E-02	1.03E-02		-1.03
Anxa5	5.26E-01	4.68E-01		-1.12	2.27E-01	2.81E-01		1.24	4.00E-01	5.81E-01		1.45
Bax	1.24E+00	8.74E-01		-1.42	4.26E-01	5.47E-01		1.28	2.69E+00	3.86E+00		1.44
Bcl2	9.68E-02	1.55E-01		1.60	6.52E-02	7.96E-02		1.22	9.04E-02	9.94E-02		1.10
Bcl2l1	2.95E-02	2.94E-02		-1.01	8.14E-03	1.65E-02		2.02	1.25E-02	1.54E-02		1.23
Birc2	1.56E-02	2.00E-02		1.28	1.92E-02	8.65E-03	<0.001	-2.22	1.71E-02	5.04E-02		2.95
C8a	3.26E-03	1.23E-02		3.77	3.75E-03	8.76E-04	<0.001	-4.28	1.02E-03	2.06E-03		2.01
Casp1	6.12E-01	1.14E+00		1.86	2.95E-01	3.28E-01		1.11	2.70E-01	6.92E-01		2.56
Casp3	1.08E-01	1.51E-01		1.40	1.89E-01	2.03E-01		1.07	4.73E-02	7.35E-02		1.55
Casp4	9.50E-03	4.19E-02		4.41	1.96E-02	2.27E-03	<0.001	-8.64	9.46E-03	9.44E-03		-1.00
Casp6	7.43E-03	1.53E-02		2.06	1.33E-02	5.66E-03	<0.001	-2.35	2.69E-03	1.86E-02		3.02
Ccl2	1.64E-01	2.10E-02	<0.001	-7.80	2.85E-01	4.71E-02	<0.001	-6.05	9.86E-02	8.91E-02		-1.11
Ccl5	8.53E-02	2.15E-01		2.52	9.14E-02	5.59E-02		-1.63	4.73E-02	1.14E-01		2.42
Ccr3	1.46E-02	5.35E-02		3.67	1.45E-02	5.46E-03		-2.66	3.93E-02	4.75E-02		1.21
Cd14	9.72E-02	1.01E-01		1.04	1.29E-01	2.00E-02	<0.001	-6.45	1.02E-01	1.42E-01		1.40
Cd1d1	8.09E-03	2.45E-02		3.03	3.88E-03	1.57E-03		-2.46	2.39E-03	5.49E-03		2.30
Cd65	6.55E-03	1.27E-02		1.94	4.64E-03	4.42E-03		-1.05	9.43E-03	1.71E-02		1.82
Cdh5	4.22E-02	4.04E-02		-1.04	1.07E-02	1.86E-02		1.74	5.78E-02	3.21E-02		-1.80
Cflar	3.75E-02	4.69E-02		1.25	1.23E-02	1.52E-02		1.24	8.61E-03	1.39E-02		1.61
Cfp	6.28E-03	1.38E-02		2.20	1.44E-02	1.23E-03	<0.001	-11.70	2.77E-02	4.22E-02		1.52
Chuk	6.83E-02	9.33E-02		1.37	4.52E-02	4.09E-02		-1.11	3.95E-02	5.10E-02		1.29
Clec7a	8.30E-03	2.23E-02		2.69	1.89E-02	1.29E-03	<0.001	-14.71	2.03E-02	1.98E-02		-1.02
Col18a1	2.04E-02	2.09E-02		1.02	3.59E-03	8.30E-03		2.31	1.55E-02	2.01E-02		1.30
Colec12	5.84E-02	7.81E-02		1.34	2.61E-02	1.02E-02		-2.55	6.92E-02	6.94E-02		1.00
Cpb2	5.32E-02	5.20E-02		-1.02	1.86E-02	1.77E-02		-1.05	5.31E-03	2.18E-03		-2.44
Cradd	1.52E-01	1.98E-01		1.30	1.54E-01	1.24E-02	<0.001	-12.41	9.13E-03	4.09E-03		-2.23
Crp	2.33E-03	7.51E-03		3.23	1.84E-03	4.03E-04	<0.001	-4.57	3.77E-04	1.06E-03	<0.001	2.81
Csf2	8.20E-03	1.46E-02		1.78	1.13E-02	3.76E-03		-3.01	9.70E-04	8.33E-03		8.58
Cx3cl1	2.42E-02	2.69E-02		1.11	1.08E-02	9.14E-03		-1.18	1.26E-02	1.59E-02		1.26
Cxcl1	4.33E-03	2.05E-02		4.73	2.33E-03	7.57E-04	<0.001	-3.08	4.97E-04	8.39E-03		16.88
Cxcl2	3.65E-02	4.68E-02		1.28	1.55E-02	7.65E-02		4.93	1.43E-02	2.31E-02		1.62
Cxcr4	1.18E-02	2.93E-02		2.49	2.81E-01	5.68E-03	<0.001	-49.46	5.54E-02	6.13E-02		1.11
Cxcr5	1.88E-02	2.52E-03	<0.001	1.34	2.46E-02	3.81E-03	<0.001	-2.51	1.93E-02	3.60E-02		1.87
Cybb	1.20E-02	1.07E-02		-1.13	4.32E-01	2.15E-03	<0.001	-201.14	5.34E-02	5.58E-02		1.04
Defb4	1.05E-03	5.48E-03	<0.001	5.24	2.64E-03	2.09E-04	<0.001	-12.64	3.63E-04	2.19E-04		-1.66
Dmbt1	4.95E-03	1.00E-02		2.02	2.44E-03	1.23E-03		-1.99	2.43E-03	2.16E-03		-1.13
Edn1	1.27E-02	1.72E-02		1.36	7.39E-03	5.53E-03		-1.34	5.40E-03	1.33E-02		2.47
Edn2	5.31E-02	1.46E-01		2.74	1.77E-02	2.18E-02		1.23	3.44E-03	2.54E-02		7.38
Ednra	8.11E-02	1.02E-01		1.26	4.73E-02	5.89E-02		1.24	1.77E-02	4.16E-02		2.35
Fas	3.55E-03	5.92E-03		1.67	1.39E-03	2.26E-03		1.63	2.12E-02	1.07E-02		-1.98
FasL	1.29E-01	2.96E-02	<0.001	-4.35	7.66E-02	5.08E-01		6.63	3.72E-02	1.11E-02		-3.34
Fgf1	1.70E-02	2.50E-02		1.47	8.20E-03	4.00E-02		4.88	1.15E-02	1.65E-02		1.43
Flt1	1.27E-01	1.27E-01		1.01	4.05E-02	5.83E-02		1.44	3.94E-02	4.61E-02		1.17
Fn1	1.21E-01	1.14E-01		-1.07	6.67E-02	6.87E-02		1.03	1.18E+00	8.81E-01		-1.34
Hc	5.87E-03	1.33E-02		2.26	2.01E-03	6.69E-04		-3.01	9.77E-04	1.60E-03		1.64
Hmox1	2.75E-02	6.86E-02		2.49	4.26E-02	1.78E-02		-2.39	6.73E-02	1.28E-01		1.90
Icam1	1.24E-01	1.32E-01		1.06	1.16E-01	1.51E-01		1.30	1.06E-01	9.72E-02		-1.09
Ifnb1	4.74E-03	6.23E-03		1.32	1.21E-03	4.08E-04	<0.001	-2.96	3.43E-04	1.99E-03		5.82
Ifngr1	6.22E-02	4.85E-02		-1.28	3.07E-02	2.34E-02		-1.31	3.68E-02	6.98E-02		1.89
Ifngr2	1.24E-01	1.07E-01		-1.17	1.19E-01	7.54E-02		-1.58	9.01E-02	9.38E-02		1.04
Ikbkb	1.27E-02	2.44E-02		1.93	1.35E-02	3.18E-03	<0.001	-4.24	1.19E-02	9.29E-03		-1.28
Il10	1.75E-02	2.53E-02		1.45	1.34E-02	1.13E-03	<0.001	-11.86	3.39E-03	3.54E-03		1.05
Il11	2.86E-03	1.73E-02	<0.001	6.05	7.15E-04	2.15E-03		3.00	8.23E-04	6.79E-03		8.24
Il12rb2	8.03E-04	7.59E-03	<0.001	9.45	4.75E-04	8.15E-05		-5.82	2.08E-04	2.28E-04		1.10
Il1a	1.40E-02	1.30E-02		-1.08	9.15E-03	1.16E-03	<0.001	-7.90	2.60E-03	3.49E-03		1.34
Il1b	1.05E-02	3.87E-02		3.70	1.48E-01	1.08E-02	<0.001	-13.67	1.63E-02	1.40E-02		-1.16
Il1f10	2.04E-03	1.12E-02		5.48	9.39E-04	5.12E-04		-1.84	3.46E-04	1.04E-03		2.99
Il1f5	6.49E-03	1.05E-02		1.62	2.61E-03	1.17E-03		-2.23	1.41E-03	3.06E-03		2.17
Il1f6	1.68E-03	3.72E-03		2.22	1.60E-03	2.12E-04	<0.001	-7.56	1.89E-04	2.48E-04		1.31
Il1f8	3.09E-04	5.74E-03	<0.001	18.54	2.10E-03	5.04E-04		-4.18	1.25E-03	1.21E-03		-1.02
Il1f9	3.40E-03	5.11E-03		1.50	3.15E-02	4.61E-04	<0.001	-68.40	1.56E-03	2.77E-03		1.77
Il1r1	5.15E-02	1.24E-01		2.40	3.51E-02	1.91E-02		-1.84	4.90E-02	7.49E-02		1.53
Il1r2	4.79E-02	1.82E-01	<0.001	3.81	1.93E-01	1.97E-02	<0.001	-9.78	1.84E-02	1.70E-02		-1.09
Il1rap	1.83E-02	2.55E-02		1.39	2.42E-02	4.40E-03	<0.001	-5.50	1.37E-02	1.48E-02		1.09
Il1rap12	1.02E-03	3.05E-03		2.98	9.43E-04	4.50E-04		-2.10	6.44E-04	3.79E-04		-1.70
Il1rl2	4.25E-03	3.81E-03		-1.12	1.99E-03	6.74E-04		-2.95	2.34E-03	2.71E-03		1.16
Il1rn	2.51E-03	2.76E-02	<0.001	10.96	8.70E-03	1.43E-03	<0.001	-6.07	1.55E-02	1.69E-02		1.09

Gene Symbol	2 ^{-dct} (H6)		p-value	Fold variation	2 ^{-dct} (H24)		p-value	Fold variation	2 ^{-dct} (H72)		p-value	Fold variation
	LR12scr	LR12			LR12scr	LR12			LR12scr	LR12		
Il3	6.67E-03	1.78E-02		2.67	2.83E-03	1.45E-03		-1.95	1.04E-03	9.16E-03		8.78
Il6	6.47E-03	5.68E-03		-1.14	4.68E-02	7.80E-03	<0.001	-5.93	3.30E-03	5.60E-03		1.70
Il7	4.21E-03	1.27E-02		3.01	3.75E-03	2.54E-03		-1.48	2.28E-03	5.51E-03		2.42
Irak1	2.53E-02	2.48E-02		-1.02	1.52E-02	2.35E-02		1.55	1.38E-02	2.60E-02		1.88
Irak2	7.95E-02	6.32E-02		-1.26	5.88E-02	1.80E-02	<0.001	-3.26	1.37E-02	2.32E-02		1.70
Irf1	2.98E-02	4.91E-02		1.65	3.07E-02	8.80E-03	<0.001	-3.48	3.40E-02	4.81E-02		1.35
Itga5	7.07E-02	1.82E-01		2.58	1.46E-01	1.24E-01		-1.18	1.03E-01	9.45E-02		-1.09
Itgav	1.25E-01	1.28E-01		1.02	5.15E-02	4.78E-02		-1.08	1.07E-01	1.52E-01		1.42
Itgb1	8.25E-01	4.92E-01		-1.68	4.54E-01	8.42E-01		1.86	4.72E-01	2.28E-01		-2.07
Itgb3	1.92E-02	3.88E-02		2.02	2.07E-02	9.46E-03	<0.001	-2.18	1.72E-02	3.06E-02		1.78
Kdr	4.67E-01	5.00E-01		1.07	7.28E-02	2.81E-01		3.85	1.59E-01	1.29E-01		-1.23
Kit	1.94E-02	4.63E-02		2.39	1.69E-02	9.75E-03		-1.73	8.78E-03	1.65E-02		1.88
Lalba	3.17E-03	8.09E-03		2.55	2.20E-03	4.02E-04		-5.47	4.06E-04	7.49E-04		1.84
Lbp	9.93E-03	2.25E-02		2.27	2.89E-02	6.61E-03	<0.001	-4.38	1.03E-02	1.96E-02		1.89
Ltf	1.08E-02	1.56E-02		1.45	2.11E+00	5.62E-03	<0.001	-374.70	6.92E-04	1.29E-03		1.87
Ly96	2.30E-02	3.13E-02		1.36	1.56E-02	5.85E-03		-2.67	1.37E-02	1.70E-02		1.25
Lyz1	4.40E-01	3.03E-01		-1.45	1.84E+00	1.82E-01	<0.001	-10.09	4.35E+00	4.40E+00		1.01
Mapk14	4.96E-02	5.30E-02		1.07	5.74E-02	1.68E-02	<0.001	-3.41	2.84E-02	3.50E-02		1.23
Mapk8	1.66E-02	2.11E-02		1.27	1.73E-02	7.62E-03		-1.81	9.78E-03	7.84E-03		-1.25
Mif	5.72E-01	4.42E-01		-1.30	4.36E-01	3.79E-01		-1.15	6.28E-01	6.80E-01		1.08
Mmp1a	2.99E+00	1.28E+01	<0.001	4.28	9.20E-01	7.08E+00	<0.001	7.70	1.13E+00	1.15E+00		1.02
Mmp2	2.05E-01	4.38E-01		2.14	8.94E-02	1.61E-01		1.80	1.84E-01	2.61E-01		1.42
Mmp9	1.28E-02	3.72E-02		2.91	2.70E-01	1.50E-02	<0.001	-17.95	6.85E-02	3.23E-02		-2.12
Myd88	2.69E-03	3.16E-03		1.18	7.60E-03	1.10E-03		-6.93	2.71E-03	2.36E-03		-1.15
Naip1	3.77E-01	2.28E-01		-1.65	1.22E-01	2.03E-01		1.67	3.81E-02	4.24E-02		1.11
Ncf4	1.66E-02	4.74E-02		2.86	1.55E-01	5.97E-03	<0.001	-26.02	5.45E-02	8.01E-02		1.47
Nfkb1	4.50E-02	4.16E-02		-1.08	4.98E-02	2.02E-02		-2.47	2.88E-02	5.12E-02		1.77
Nfkb2	5.68E-03	4.11E-03		-1.38	2.00E-03	2.88E-04		-6.95	5.61E-04	2.17E-03		3.87
Nfkbia	8.56E-01	3.58E-01		-2.39	4.50E-01	1.07E-01	<0.001	-4.19	9.68E-02	1.51E-01		1.56
Nlr4	3.70E-03	6.25E-03		1.69	3.09E-03	1.05E-03		-2.93	7.63E-04	1.70E-03		2.23
Nos2	2.63E-02	5.44E-02		2.06	2.85E-02	8.77E-03	<0.001	-3.25	4.37E-02	4.40E-02		1.01
Nos3	1.06E+00	8.52E-01		-1.26	1.92E+00	5.27E+00		2.74	6.69E-01	3.88E-01		-1.72
Nppb	3.96E-02	6.70E-02		1.69	1.35E-02	2.47E-02		1.83	1.44E-02	2.57E-02		1.79
Npr1	8.23E-03	3.31E-02		4.02	3.73E-03	2.34E-03		-1.59	1.53E-03	6.30E-03		4.11
Ocln	1.26E-01	1.86E-01		1.48	5.33E-02	7.73E-02		1.45	6.01E-02	7.24E-02		1.21
Pdgfra	4.04E-01	3.48E-01		-1.16	1.17E-01	2.66E-01		2.27	1.51E-01	1.74E-01		1.16
Pecam1	6.94E-02	7.47E-02		1.08	9.84E-02	2.69E-02	<0.001	-3.85	4.30E-02	1.39E-01	<0.001	3.23
Pf4	2.38E-01	3.62E-01		1.52	9.65E-02	2.74E-01		2.84	1.48E-01	1.46E-01		-1.01
Pgf	6.71E-02	7.71E-02		1.15	5.57E-02	4.33E-02		-1.28	8.91E-03	2.98E-02	<0.001	3.34
Pgcyrp1	1.33E-02	2.13E-02		1.60	1.02E+00	4.74E-03	<0.001	-215.81	5.57E-03	4.57E-03		-1.22
Pgcyrp2	2.15E-03	1.42E-02		6.62	4.34E-03	3.72E-04		-11.67	3.54E-04	6.77E-04		1.91
Pgcyrp3	2.21E-03	8.05E-03		3.64	7.02E-05	3.59E-04		5.12	2.38E-03	2.36E-03		-1.01
Plat	8.04E-02	1.61E-01		2.00	4.88E-02	5.87E-02		1.20	3.50E-02	6.95E-02		1.99
Plau	8.89E-03	1.02E-02		1.15	1.84E-02	4.11E-03	<0.001	-4.00	2.44E-02	2.74E-02		1.12
Plg	6.34E-03	1.07E-02		1.69	2.99E-03	2.15E-03		-1.39	8.77E-04	6.03E-03		6.88
Ppbb	5.91E-02	5.70E-02		-1.04	2.94E-02	4.61E-03	<0.001	-6.39	2.66E-02	2.76E-02		1.03
Prg2	5.14E-03	1.03E-02		2.00	6.68E-03	6.37E-04		-10.49	8.27E-04	9.37E-04		1.13
Proc	1.06E-03	7.82E-03		7.18	9.44E-04	4.08E-04		-2.31	1.84E-04	2.19E-04		1.19
Ptgls	1.58E-02	4.88E-02		3.09	1.12E-02	7.70E-03		-1.46	1.04E-02	1.97E-02		1.89
Rhob	1.09E-01	1.48E-01		1.36	9.57E-02	1.43E-01		1.50	1.27E-01	5.74E-02		-2.21
Ripk1	3.01E-02	8.76E-02		2.91	2.15E-02	6.08E-03	<0.001	-3.54	7.30E-03	1.07E-02		1.46
Sele	2.84E-02	7.31E-02		2.58	2.40E-02	1.48E-02		-1.62	8.25E-03	9.29E-03		1.13
Sell	1.45E-03	1.18E-02		8.12	5.54E-02	1.97E-03	<0.001	-28.19	4.44E-03	3.29E-03		-1.35
Selp	8.15E-02	3.43E-01		4.21	5.52E-02	2.39E-02	<0.001	-2.31	3.00E-02	3.77E-02		1.26
Selpg	1.32E-02	3.33E-02		2.53	5.93E-02	5.44E-03	<0.001	-10.90	3.17E-02	4.66E-02		1.47
Serpina1a	5.87E-03	2.76E-02		4.71	4.23E-03	1.18E-03	<0.001	-3.64	1.61E-03	1.54E-03		-1.05
Serpine1	8.65E-02	8.47E-02		1.27	1.22E-01	3.33E-02	<0.001	-3.67	5.53E-02	7.75E-02		1.40
Sftpd	3.59E-03	9.53E-03		2.66	2.49E-03	5.64E-04		-4.42	1.28E-03	1.26E-03		-1.02
Sod1	6.16E-01	2.65E-01		-2.32	3.46E-01	1.18E+00	<0.001	3.42	4.28E-02	1.41E-01	<0.001	3.31
Stab1	5.07E-02	5.11E-02		1.01	3.16E-02	7.37E-03	<0.001	-4.30	9.66E-02	1.42E-01		1.47
Tek	7.80E-02	1.05E-01		1.35	3.33E-02	4.93E-02		1.48	3.22E-02	5.42E-02		1.68
Tfpi	1.18E-02	1.03E-02	<0.001	-1.14	1.08E-02	9.50E-03		-1.14	5.25E-03	7.61E-03		1.45
Tgfb1	5.88E-02	5.85E-02		-1.01	6.26E-02	1.13E-02	<0.001	-5.53	5.24E-02	8.29E-02		1.58
Thbd	9.09E-02	1.64E-01		1.80	9.41E-02	4.21E-02	<0.001	-2.23	2.18E-02	2.30E-02		1.06
Thbs1	4.01E-01	6.65E-01		1.66	2.49E-01	1.02E-01	<0.001	-2.45	1.88E-01	1.32E-01		-1.42
Timp1	1.23E-02	1.05E-01	<0.001	8.53	2.61E-02	2.10E-01	<0.001	6.24	3.32E-01	4.81E-01		1.45
Tlr1	4.73E-03	1.71E-02		3.60	7.78E-03	1.83E-03	<0.001	-4.24	1.08E-02	9.77E-03		-1.11
Tlr2	1.11E-02	1.36E-02		1.23	2.16E-02	1.24E-03	<0.001	-17.41	1.12E-02	1.15E-02		1.02
Tlr3	8.14E-03	2.73E-02	<0.001	3.35	6.02E-03	4.02E-03		-1.50	6.54E-03	1.04E-02		1.59
Tlr4	2.62E-02	4.65E-02		1.78	3.38E-02	6.82E-03	<0.001	-4.95	2.62E-02	2.86E-02		1.09
Tlr6	6.65E-03	2.29E-02	<0.001	3.45	1.25E-02	2.37E-03	<0.001	-5.25	1.03E-02	7.85E-03		-1.31
Tlr8	5.39E-03	1.08E-02		2.00	5.27E-03	1.30E-03	<0.001	-4.06	1.44E-02	1.59E-02		1.10
Tlr9	5.07E-03	1.64E-02		3.23	5.42E-03	6.56E-04		-8.26	2.60E-03	4.58E-03		1.72
Tnf	4.84E-03	7.43E-03		1.54	2.52E-02	6.42E-04	<0.001	-39.26	1.40E-03	2.25E-03		1.61
Tnfrsf3	1.26E-02	2.43E-02		1.92	3.71E-03	7.86E-03		2.12	1.56E-02	2.55E-02		1.63
Tnfrsf1a	3.54E-02	3.88E-02		1.09	5.30E-02	5.31E-02		1.00	5.42E-02	7.39E-02		1.36
Tnfrsf10	8.06E-03	2.82E-02		3.50	3.32E-03	2.42E-03		-1.37	3.90E-04	6.62E-03		16.70
Tollip	6.61E-02	7.39E-02		1.12	4.14E-02	4.52E-02		1.09	2.65E-02	4.45E-02		1.68
Traf6	4.54E-02	3.13E-02		-1.45	2.27E-02	9.71E-03		-2.34	1.12E-02	1.64E-02		1.46
Trem1	5.75E-03	1.39E-02		2.41	4.53E-02	2.35E-03	<0.001	-19.25	4.83E-03	7.58E-03		1.57
Tymp	1.76E-01	1.00E-01		-1.76	1.08E-01	1.60E-01		1.47	8.48E-02	6.81E-02		-1.28
Vcam1	2.24E-02	8.11E-02		3.62	1.97E-02	7.43E-03	<0.001	-2.64	2.80E-02	6.63E-02		2.37
Vegfa	7.66E-01	1.46E+00		1.90	2.06E-01	1.07E-01	<0.001	-1.93	1.04E-01	6.18E-01	<0.001	5.94
Vwf	9.08E-02	1.09E-01		1.20	4.18E-02	3.41E-02		-1.23	3.47E-02	4.86E-02		1.40

Genes whose expression varies significantly at least 3 fold (as compared to no MI) at 24 hours after MI are highlighted in grey.

2. PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF TREM-1 LIMITS REPERFUSION INJURY IN A PORCINE MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION

ESC Heart Failure.2015;2:90-99

L'objectif de ce travail a été d'évaluer le rôle de TREM-1 et de sa modulation pharmacologique dans un modèle expérimental mimant le plus fidèlement possible l'infarctus du myocarde en pathologie humaine. En effet, nous avons utilisé un modèle porcin dont la physiologie cardiovasculaire est proche de celle de l'Homme, et qui constitue un modèle reconnu pour les études précliniques dans ce domaine. Dans cette optique de pertinence clinique, un modèle peu invasif à thorax fermé et abord endovasculaire a été préféré. Un monitoring hémodynamique avancé utilisant les données du cathétérisme cardiaque droit et du cathétérisme intraventriculaire gauche a été réalisé avant, pendant et jusqu'à 18 heures après une occlusion coronaire transitoire de l'artère interventriculaire antérieure (IVA).

La modulation pharmacologique de TREM-1 juste avant la reperfusion coronaire et dans les heures suivant cette désobstruction permet d'améliorer la fonction contractile cardiaque, de limiter la taille de l'infarctus, d'améliorer les paramètres hémodynamiques ainsi que les dysfonctions d'autres organes tels que les poumons et les reins.

Ce travail sur le gros animal, complémentaire de l'approche murine détaillée dans la précédente publication, confirme le rôle de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde chez une espèce phylogénétiquement plus proche de l'Homme, ainsi que l'intérêt de sa modulation pharmacologique avec un protocole d'administration pertinent par rapport au contexte clinique.

INTRODUCTION

Over the last 30 years, timely reperfusion strategies have dramatically improved survival rates in patients suffering from acute myocardial infarction (AMI).²⁰ Despite this impressive success, mortality and onset of heart failure in survivors remain worrying. Novel therapeutic strategies are definitely needed to further improve myocardial salvage, as infarct size is closely linked to prognosis. Although reperfusion strategies are the cornerstone of myocardial salvage at the acute phase of AMI, they can worsen myocardial injury by themselves. This “double-edge sword” is termed “myocardial reperfusion injury” phenomenon (RI). Indeed, RI could be responsible for up to half the final infarct size and could therefore be targeted to limit myocardial damage.¹³²

Toll-like receptors (TLRs) are highly conserved throughout species and act as sensors of danger signals. They recognize exogenous – pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) – or endogenous – damage-associated molecular patterns (DAMPs) – molecules and induce innate immune response. During myocardial reperfusion, necrotic cells and damaged extracellular matrix components produce large amounts of DAMPs, which, in turn, activate TLRs signaling. It then promotes a pro-inflammatory environment, especially through the activation of NF- κ B pathway which has repeatedly been implicated in innate immunity activation and generation of lethal RI after cardiac ischemia.^{131,133} As TLRs are implicated at the earliest stages of the inflammatory chain reaction, they appear ideal therapeutic targets for limitation of RI.¹³⁴ Among TLRs present in the heart, TLR-2 and TLR-4 have the highest expression levels and have been extensively investigated in the context of RI.¹³⁵

TREM-1 is an immune-receptor expressed by neutrophils, macrophages, and mature monocytes. It acts as an amplifier of the innate immune response triggered by TLRs engagement.¹² It had regularly been shown that blockade of TREM-1 activation protected from hyper-responsiveness and death in various models of severe infection.^{17,122,125,136} Beyond infectious diseases, TREM-1 has also been found important during aseptic inflammatory disorders.^{137–141}

The role of the immune system after cardiac ischemia is ambivalent as, on one hand it appears crucial for debridement of the infarcted myocardium, but on the other hand it leads to increased infarct size and detrimental ventricular remodeling. Considering this, a fine-tuning of the immune response is required. Indeed, attempts to completely inhibit inflammation have

failed to improve outcome.^{106–110,142} Of note, TREM-1 inhibition does not abrogate immune response but limits its self-amplification, and could therefore allow for a fine-tuning between required and deleterious inflammatory signals.

We thus investigated LR12, an inhibitory TREM-1 peptide that acts as a decoy receptor and binds to the yet unknown TREM-1 ligand¹¹, during cardiac ischemia in a clinically relevant model of reperfused MI in adult minipigs. We show that LR12 improves hemodynamic parameters and cardiac function, and limits remote organ dysfunction.

METHODS

The experiments were performed in adherence with the National Institutes of Health Guidelines on the Use of Laboratory Animals and were approved by the „Comité d'éthique en expérimentation animale n°66" (Animal experiments ethical committee #66) under the agreement number 00492.02. Our protocol was adapted from previously published ones.^{143,144}

Animal Preparation

Adult male minipigs (*Sus scrofa domestic*, Vietnamese pot-bellied mini-pigs, 40-68 kg) were purchased from Elevage Ferry (Vosges, France). Before surgery, animals were acclimated to the animal department for at least 5 days and fasted overnight with free access to water. Preanesthesia was performed through intramuscular injection of ketamine (10 mg/kg). Anesthesia was induced and maintained with intravenously administered pentobarbital (initial bolus : 10 mg/kg, continuous infusion 10-12 mg/kg/h during the preparation period and 6-8mg/kg/h after coronary occlusion), intermittent sufentanyl (10µg every 2 hours) and cisatracurium (Nimbex, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) if necessary. Animals were mechanically ventilated (tidal volume 7 mL/kg, positive end-expiratory pressure 4 cmH₂O, FiO₂ 0.3, respiratory rate 16-18 breaths/min adjusted to maintain normocapnia).

Right jugular vein was exposed and a multi-lumen central line was inserted for perfusion and Swan-Ganz catheter insertion, allowing for the continuous recording of cardiac output (CO), SvO₂, and right atrial and pulmonary arterial pressures (14 Fr multi-lumen access combining a 8 Fr sheath introducer and 2 conventional central lines, MAC, Teleflex Medical SAS, Le Faget, France). A 5 Fr introducer was placed in the right carotid artery and a combined pressure-conductance catheter (Ventri-Cath 507, Millar Inc, Houston, Texas, USA)

was positioned within the left ventricle under X-ray guidance for cardiac function assessment. A right femoral arterial 7 Fr introducer was inserted for coronary catheter access and continuous measurement of arterial pressure. Right femoral vein was also catheterized (12 Fr introducer) and an 8-14 Fr Fogarty catheter (Edwards Lifesciences, Nyon, Switzerland) was placed for transient vena cava occlusion (VCO). A catheter in the bladder allowed urine collection. The animals received 2500 IU heparin, repeated every 4 hours to avoid blood clotting of catheters, and 5 mg/kg amiodarone (Sanofi-Aventis, Paris, France) one hour before coronary occlusion to limit cardiac arrhythmias.

After surgery, animals were allowed to recover for 2 hours before baseline measurements (defined as “H0”). Balanced saline solution (Isofundine, B Braun Medical SAS, Boulogne-Billancourt, France) was continuously administered (10 mL/kg/h) throughout the study. Body temperature was kept constant ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) using cold accumulators.

Experimental protocol

The timeline is presented in **Figure 1**. After baseline data collection (H0), myocardial infarction was induced by inflation of an angioplasty balloon in the proximal left anterior descending artery (LAD). An angiogram was performed after inflation of the balloon in order to verify the complete occlusion of LAD. Four animals died from refractory ventricular tachycardia within 15 minutes after LAD occlusion and were therefore excluded from further analyses. After 45 minutes, animals were randomized to receive LR12 (LR12 group, n = 7) or the vehicle (PBS) alone (control group, n = 8). LR12 consists of a 12-amino-acid (aa) part of the extracellular domain of TLT-1 (LQEEDAGEYGCM) and was chemically synthesized (Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands) as COOH terminally amidated peptide. The correct compound, free of endotoxin, was obtained with greater than 99% yield and was homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed-phase high performance liquid chromatography. This lyophilized peptide was extemporaneously solubilized in sterile PBS under aseptic conditions. A bolus of 5 mg/kg (in 150 ml) was intravenously delivered over 15 min, then a 1 mg/kg/h (30 ml/h) continuous infusion was started and lasted throughout the study period. This dosage was derived from previous experiments performed in minipigs and corresponded to the best effective dose.¹²² Control animals received the same amount of vehicle (sterile PBS). After a LAD occlusion period of 60 min, the balloon was deflated. An angiogram was performed in order to verify the restoration of the blood flow in the previously occluded artery. Sedation and mechanical ventilation were maintained throughout the 18-hour study period.

Experienced intensive care physicians, blinded for the given treatment, provided animal care. The main hemodynamic targets were to maintain mean arterial pressure (MAP) above 85 mmHg, cardiac index above 2.0 L/min/m² and SvO₂ above 60%. To achieve these goals, rapid fluid loading (Isofundine, B Braun Medical SAS, Boulogne-Billancourt, France) was allowed provided that right atrial pressure (RAP) and pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) remained lower than 18 mmHg. In case of incomplete hemodynamic improvement, a continuous infusion of norepinephrine and/or dobutamine was started.

Animals were then killed under deep anesthesia by KCl infusion 18 h after the induction of myocardial infarction.

Measurements

Hemodynamic parameters were continuously monitored throughout the study period and recorded at baseline, every 15 min from H0 to H1.5 and every 2 h from H2 to H18. The recorded parameters included MAP, mean pulmonary artery pressure (MPAP), cardiac output, cardiac index and SvO₂. Systemic oxygen delivery (DO₂) and systemic oxygen uptake (VO₂), PVRi and SVRi (pulmonary and systemic vascular resistance index) were calculated by the Swan-Ganz monitor (Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA). Cardiac Power Index (W/m²) was calculated as MAP*cardiac index/451.¹⁴⁵

Pressure-volume (PV) catheter was calibrated before data recordings. The arbitrary relative volume unit number was converted to true volume using pre-warmed Rho calibration cuvette device (reference 910-1060, Millar Inc, Houston, Texas, USA) to determine resistivity of body-temperature heparinized blood. Parallel conductance (*i.e.* non-LV blood conductance) was estimated by injection of 2.5 mL NaCl 10% into the pulmonary arterial line with simultaneous LV PV sampling. Pressure sensor was electronically calibrated with MPVS*Ultra* Control Interface Software, according to manufacturer's recommendations. PV catheter-based parameters were recorded every 2 h from H0 to H18. The ventilator was disconnected for 10s and steady-state parameters were collected, including dP/dt_{max}, dP/dt_{min} (maximum and minimum values of the first derivative of ventricular pressure), end-diastolic and end-systolic volumes of the left ventricle (EDV, ESV), ejection fraction (LVEF), Tau (time constant of LV pressure decay by Glantz method) and stroke work (SW, *i.e.* the work performed by the left ventricle to eject the stroke volume into the aorta, calculated as the area within the PV loop). Immediately after, the Fogarty catheter was inflated in the inferior vena cava and preload-alternating PV data were collected during this VCO (vena cava

occlusion) run, including end-systolic and end-diastolic pressure volume relationships (ESPVR and EDPVR), maximum ventricular elastance (E_{max}), arterial elastance (E_a), “dP/dt $_{max}$ to EDV” relationship, preload recruitable stroke work (PRSW), and Pressure-Volume Area (PVA). ESPVR, “dP/dt $_{max}$ to EDV” relationship and PRSW are indexes of myocardial contractility that are relatively insensitive to pre- and afterload. PVA is the specific area in the pressure-volume plane bounded by the ESPVR and EDPVR lines and the systolic segment of the PV loop. It is linearly correlated to left ventricular oxygen consumption.

Blood was sequentially drawn (H0, H2, H6, H12 and H18) for the determination of blood gases, arterial lactates, plasma concentration of alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, and creatine phosphokinase (CK). Troponin I was determined by ELISA according to manufacturer’s instructions (porcine cardiac troponin I ELISA kit, MBS024086, MyBioSource Inc, San Diego, USA).

Statistical analysis

After testing for their normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test), data are presented as means $\pm$ SD. Between group differences were tested by two-way ANOVA for repeated measures with Bonferroni correction or Student’s t test when appropriate. Analyses were performed using GraphPad Prism software.

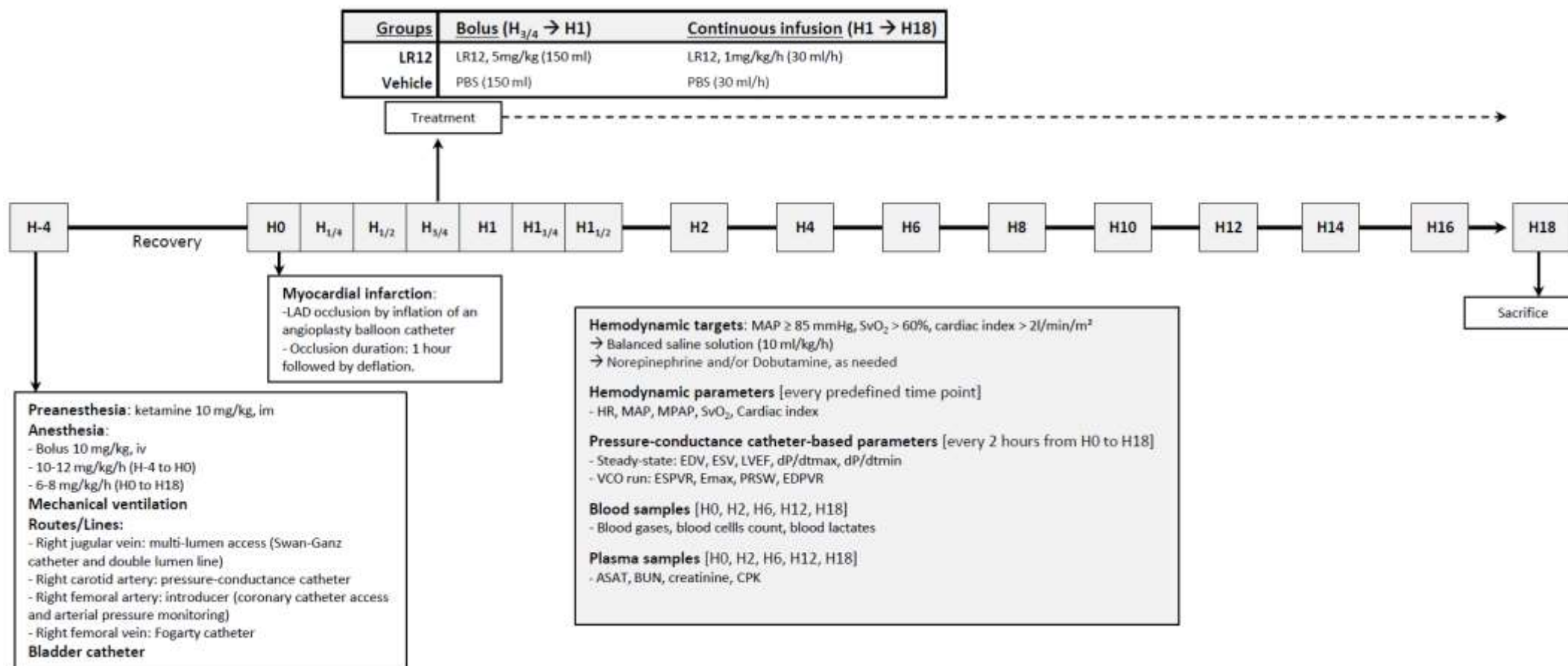


Figure 1 : Experimental timeline

LAD refers to left anterior descending coronary artery; PBS, phosphate buffered saline; MAP, mean arterial pressure; SvO₂, mixed venous oxygen saturation; HR, heart rate; MPAP, mean pulmonary arterial pressure; EDV, end diastolic volume; ESV, end systolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; dp/dtmax, pressure development during isovolumic contraction; dp/dtmin, pressure development during isovolumic relaxation; VCO, vena cava occlusion; ESPVR and EDPVR, end-systolic and end-diastolic pressure volume relationship; Emax, maximal ventricular elastance; PRSW, preload recruitable stroke work; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CK, creatine phosphokinase.

RESULTS

LR12 improves hemodynamic parameters

After an immediate similar drop following LAD occlusion, MAP progressively increased until the reperfusion where it decreased again (**Figure 2**). By H6, MAP stabilized to baseline levels in the LR12 animals whereas it further decreased in the control group (94.9% vs 71.3% of baseline value in LR12 vs controls at the end of the study, $p < 0.01$). Two animals in each group required norepinephrine to reach hemodynamic targets, with a significantly lower cumulated dose in LR12 group (0.11 ± 0.07 vs 2.85 ± 1.57 mg/kg, $p < 0.01$).

Heart rate progressively increased throughout the study in control pigs whereas it remained stable in LR12 group ($p < 0.0001$).

Myocardial ischemia induced a rapid decline of cardiac index (83.1% and 79.6% of baseline value at H1 in LR12 and controls respectively) that did not change significantly thereafter. Cardiac index was higher in LR12 than in control animals by H18 (78.9% vs 65.9% of baseline, $p < 0.01$). This translated into lower SvO₂ at H18 in the control group ($p = 0.03$). Two and 3 animals in respectively LR12 and control groups required dobutamine infusion to maintain adequate circulatory conditions, with similar cumulative dose (1.18 ± 0.33 vs 0.93 ± 0.45 µg/kg in controls and LR12 respectively, $p = 0.76$).

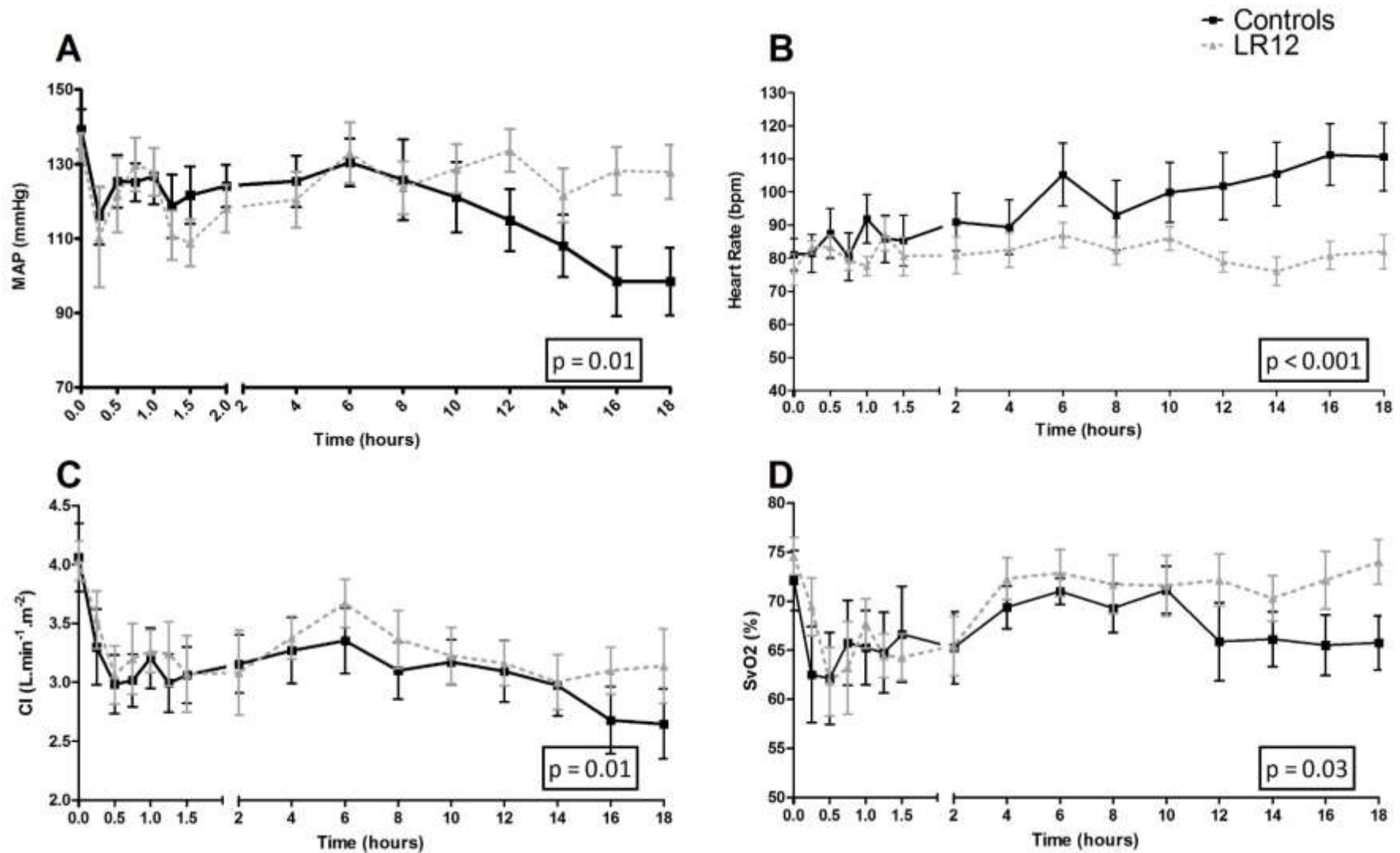


Figure 2 : LR12 improves hemodynamics

Evolution of mean arterial pressure (A), heart rate (B), cardiac index (C) and SvO₂ (D) during the study period. Hemodynamics parameters were improved in LR12-treated animals as compared to control ones.

LR12 improves cardiac function and limits infarct size

Cardiac power index, believed to better describe cardiac performance than conventional hemodynamic parameters, was significantly more depressed in controls than in LR12 pigs by H18 ($47.2 \pm 16.0\%$ vs $69.3 \pm 11.5\%$ of baseline value, $p = 0.02$) (**Figure 3**).

Pressure-volume loops studies at steady-state revealed significantly lower stroke volumes ($p = 0.002$) and LVEF in control group as compared to LR12-treated pigs ($p = 0.01$). During VCO, we noted an important decrease of PRSW in control group, corrected by LR12 administration ($p < 0.001$) (**Figure 3**). The detailed overview of the parameters obtained through PV loops studies is presented in **Table 1**.

Infarct size estimated by the area under the curve of plasma levels of CK and troponin I was significantly reduced by LR12 ($p < 0.005$) (**Figure 4a,b**).

Table 1. Selected pressure-volume loops derived parameters at baseline, 2 hours, and 18 hours after reperfusion

		H0	H2	H18
Emax (mmHg/mL)	Controls	7.2 ± 3.0	6.7 ± 4.1	6.8 ± 3.2
	LR12	7.1 ± 2.1	5.8 ± 1.0	6.6 ± 2.8
ESPVR (mmHg/mL)	Controls	4.3 ± 2.7	3.6 ± 1.8	4.3 ± 0.9
	LR12	3.8 ± 1.9	3.1 ± 1.0	3.9 ± 1.2
PRSW (mmHg/mL)	Controls	99.1 ± 16.0	$68.0 \pm 16.9^*$	$49.8 \pm 21.9^{***}$
	LR12	84.8 ± 14.7	66.1 ± 27.1	84.8 ± 20.6
EDPVR (mmHg/mL)	Controls	0.46 ± 0.39	0.61 ± 0.36	0.30 ± 0.06
	LR12	0.36 ± 0.20	0.48 ± 0.24	0.33 ± 0.07
Dp/dtmax (mmHg/s)	Controls	2332 ± 652	2333 ± 468	1941 ± 402
	LR12	2286 ± 484	2008 ± 386	2553 ± 837
Dp/dtmin (mmHg/s)	Controls	-3207 ± 549	-2548 ± 460	$-1767 \pm 402^*$
	LR12	-3389 ± 1186	-2077 ± 715	-2314 ± 499
EDV (mL)	Controls	64.9 ± 17.7	80.6 ± 14.9	$101.3 \pm 41.8^*$
	LR12	66.8 ± 23.0	63.4 ± 17.1	84.0 ± 14.7
ESV (mL)	Controls	28.6 ± 11.4	54.5 ± 26.2	$67.2 \pm 49.2^*$
	LR12	28.4 ± 15.6	34.5 ± 19.2	41.4 ± 23.3
LVEF (%)	Controls	60.6 ± 14.8	42.1 ± 14.7	$32.0 \pm 16.0^{***}$
	LR12	64.1 ± 8.5	50.0 ± 12.4	51.5 ± 10.6
EDP (mmHg)	Controls	16.5 ± 10.5	29.9 ± 13.9	19.9 ± 9.6
	LR12	21.3 ± 6.0	24.0 ± 6.0	23.2 ± 9.5
ESP (mmHg)	Controls	151.4 ± 24.7	133.8 ± 19.6	124.2 ± 22.2
	LR12	154.0 ± 22.0	124.2 ± 27.3	145.9 ± 22.7
Tau (ms)	Controls	16.4 ± 2.7	17.4 ± 7.5	21.8 ± 7.0
	LR12	16.0 ± 4.8	23.5 ± 11.2	21.8 ± 5.6
SW (mL mmHg)	Controls	4695 ± 1647	3663 ± 1285	$2312 \pm 862^*$
	LR12	5236 ± 1502	2890 ± 1278	3905 ± 1885
Ea (mmHg/mL)	Controls	4.5 ± 2.0	3.9 ± 0.7	5.5 ± 2.3
	LR12	3.8 ± 1.3	4.3 ± 1.7	4.3 ± 1.8
PVA (mmHg/mL)	Controls	11042 ± 6582	7270 ± 3340	$3619 \pm 1694^{***}$
	LR12	9552 ± 3424	6749 ± 3613	6879 ± 2082
dP/dtmax-EDV relationship	Controls	13.5 ± 5.3	24.1 ± 23.2	30.9 ± 13.7
	LR12	14.9 ± 20.2	24.4 ± 15.9	40.2 ± 36.5
SVRi (dyn s/cm ⁵ /m ²)	Controls	2539 ± 447	3074 ± 779	2831 ± 614
	LR12	2453 ± 526	3015 ± 1170	3125 ± 1023
PVRi (dyn s/cm ⁵ /m ²)	Controls	199 ± 105	246 ± 70	$400 \pm 220^{***}$
	LR12	174 ± 29	248 ± 56	220 ± 61

Emax, maximal ventricular elastance; ESPVR and EDPVR, end-systolic and end-diastolic pressure volume relationship; PRSW, preload recruitable stroke work; dP/dtmax, maximum pressure development during isovolumic contraction; dP/dtmin, minimum pressure development during isovolumic relaxation; EDV, end-diastolic volume; ESV, end-systolic volume; EDP, end-diastolic pressure; ESP, end-systolic pressure; LVEF, left ventricular ejection fraction; Tau (time constant of LV pressure decay by non-zero asymptote method); SW, stroke work; Ea, effective arterial elastance; PVA, pressure-volume area; SVRi and PVRi, systemic and pulmonary vascular resistance index (measured by pulmonary artery catheter).

* $P < 0.05$ vs. H0.

** $P < 0.05$ LR12 vs. controls.

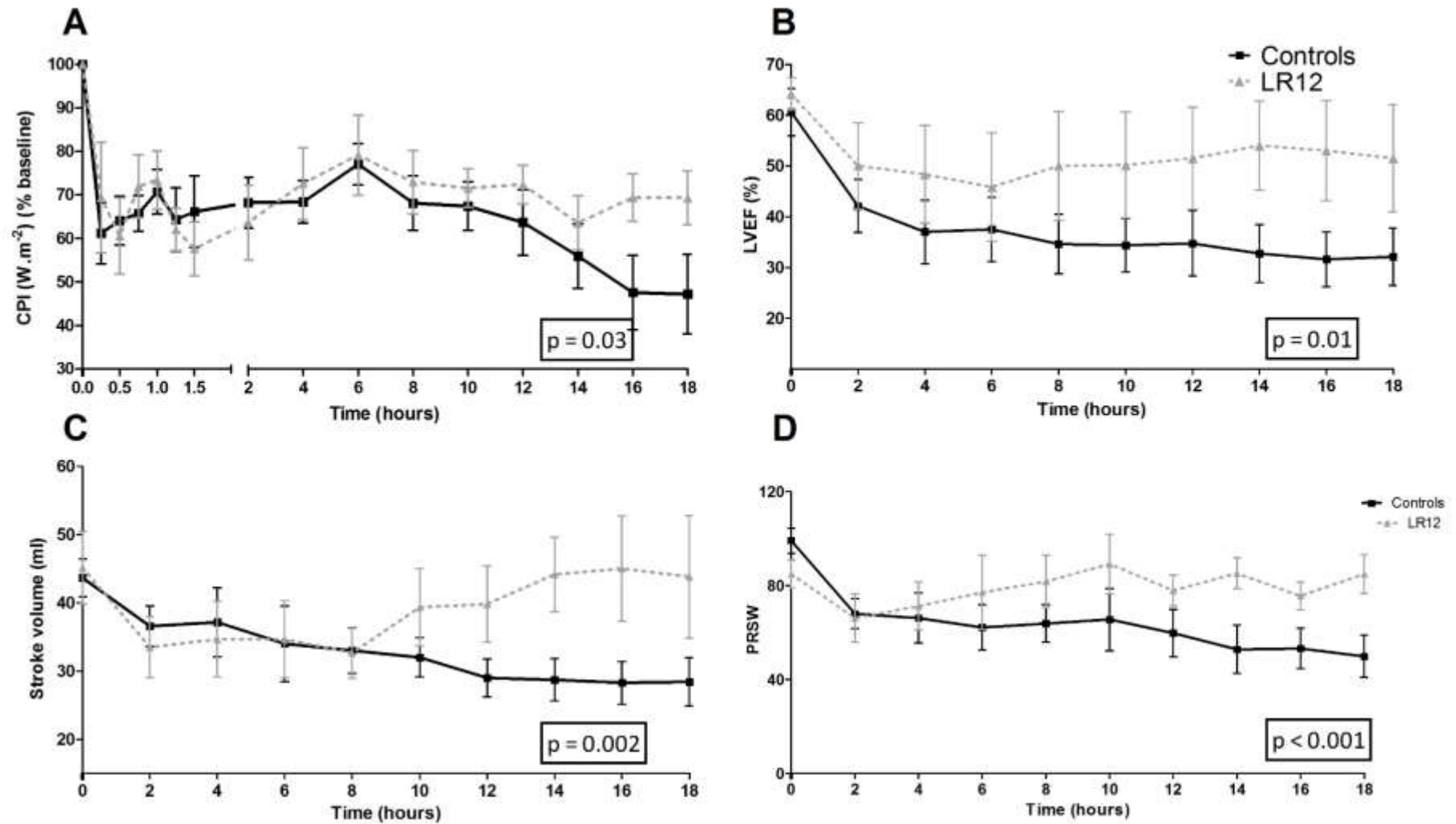


Figure 3 : LR12 improves cardiac function

Evolution of cardiac power index (A) left ventricular ejection fraction (B), stroke volume (C), stroke work (D), preload recruitable stroke work (E) and pressure-volume area (F) during the study period. Cardiac dysfunction was attenuated by LR12 treatment.

LR12 reduces organ dysfunction

One hour after myocardial reperfusion a drop of PaO₂/FIO₂ was observed in both groups. This phenomenon quickly reversed upon LR12 treatment while persisted throughout the study period in control animals (**Figure 4c**).

We also observed renal function impairment: fluid balance was more positive in control pigs ($p = 0.02$) (**Figure 4d**), and blood urea nitrogen progressively increased in controls and was higher than in the LR12 animals at the end of the study (**Table 2**).

Elevation of liver enzymes was observed as soon as 2 hours after MI in the control pigs whereas hepatic cytolysis did not occur upon LR12 treatment (**Table 2**).

Table 2. Biological parameters

		H0	H2	H18
BUN (g/L)	Controls	0.16 ± 0.07	0.15 ± 0.07	0.22 ± 0.07***
	LR12	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.06
Creatinine (mg/L)	Controls	7.03 ± 1.60	7.82 ± 1.30	7.37 ± 1.78
	LR12	6.94 ± 1.08	5.57 ± 1.12	6.42 ± 0.92
ALT (IU/L)	Controls	41 ± 24	96 ± 34*	102 ± 44***
	LR12	44 ± 24	81 ± 41	65 ± 5
Platelets Count (G/L)	Controls	330 ± 160	310 ± 160	200 ± 130*
	LR12	360 ± 70	330 ± 70	240 ± 60*
WBC (per µL)	Controls	15640 ± 5026	17225 ± 4202	23671 ± 12676*
	LR12	15786 ± 2251	20367 ± 5086	21383 ± 4672*
CPK (IU/L)	Controls	2175 ± 1076	16552 ± 8534	4770 ± 1980***
	LR12	1390 ± 782	9586 ± 6784	2620 ± 1845
Troponin (ng/mL)	Controls	0.46 ± 0.27	278.80 ± 261.70*	178.50 ± 149.30*
	LR12	0.35 ± 0.25	179.70 ± 138.80***	87.70 ± 39.80***

BUN refers to blood urea nitrogen; ALT, alanine aminotransferase; WBC, white blood cells count; CPK, creatine phosphokinase.

* $P < 0.05$ vs. H0.

** $P < 0.05$ LR12 vs. controls.

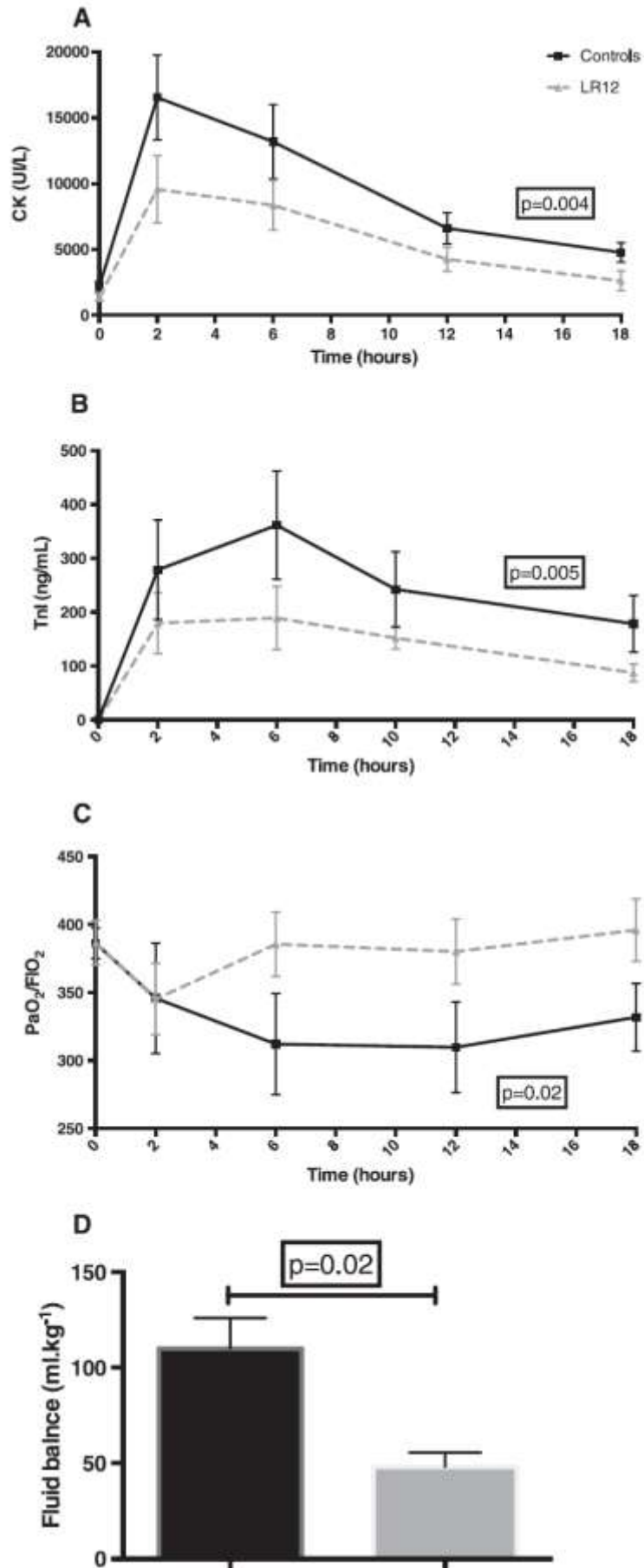


Figure 4 : LR12 improves remote organ dysfunction and limit infarct size

Evolution of creatine phosphokinase (A), and troponin I plasma concentration (B), fluid balance (C), and PaO_2 to FiO_2 ratio (D) during the study period. Myocardial infarction was associated with impaired renal function, outlined by highly positive fluid balance, and altered gas exchange. These dysfunctions were corrected by LR12 administration. Moreover, LR12 limited infarct size, as assessed by lower creatine phosphokinase and troponin I levels throughout the study period.

DISCUSSION

Failure of anti-inflammatory therapies

Similarities exist between septic states and AMI, as innate immune response is quickly initiated by tissue injury, whether related to pathogens or other sterile aggressions such as ischemia. Attempts to inhibit inflammation in the setting of septic shock or AMI have failed to improve patients' outcome. Numerous clinical trials have investigated anti-inflammatory strategies during these two acute pathological conditions, with sometimes the same evaluated drugs such as high dose corticosteroids^{117,142} or interleukine-1 β receptor antagonist.^{119,146} Despite encouraging pre-clinical data, translation in the clinic has always been disappointing: failure of anti-inflammatory approaches have been reviewed elsewhere, either during AMI¹⁴⁷ or septic shock.¹⁴⁸ However, experts in the field of cardiovascular diseases or sepsis still agree that targeting the inflammatory response could improve outcome but it would require (1) a paradigm shift taking into account the need for an adjusted balance between essential and detrimental facets of inflammation and (2) a more realistic and clinically relevant experimental approach.^{131,149}

TREM-1 acts as an amplifier of the innate immune response. Its inhibition does not completely abrogate the inflammatory response but rather attenuates it.¹² Conclusive data have been obtained by our group from several experimental animal models of septic shock, including clinically relevant species (*i.e.* pigs and non-human primates).^{122,126} These results fit with the new paradigm of limiting the magnitude of the initial inflammatory response rather than totally inhibiting it during septic shock.¹⁵⁰ These features could also fit with the unmet need for therapies that allow a fine balance between required and deleterious immune response during AMI.

Hypothetical mechanisms

Inflammatory signals in the ischemic myocardium recruit neutrophils within the first hours, with a peak at 24 hours, whereas monocytes infiltrate it later.⁸⁵ Considering the length of our study period, neutrophils are most likely to be involved than other innate immune cells. A bulk of evidence has raised the role of neutrophil-dependent myocardial injury during reperfusion through distinct mechanisms that could involve TREM-1.¹⁵¹ First, the no reflow phenomenon has been linked to neutrophils entrapment into the microvasculature. Indeed,

before infiltrating the myocardium, leukocytes interact closely with endothelial cells through complex molecular events involving integrins. This step enables leukocytes to roll along the vascular wall and then to stop, a pre-requisite to transmigration. Recently, the critical role of TREM-1 in transmigration has been shown in a different model of tissue injury (*i.e.* bacterial pneumonia), and could therefore explain some of the observed beneficial effects. In addition to microvascular obstruction, neutrophils can directly injure surrounding cardiomyocytes through the release of toxic product such as reactive oxygen species.¹⁵² Moreover, activation of the TLR4-pathway on circulating leukocytes, which is amplified by TREM-1 signaling, results in decreased cardiomyocytes contractility.¹⁵³

Reactive oxygen species (ROS) release is a critical mediator of myocardial RI. Recruited leukocytes have the potential to produce large amounts of ROS and therefore contribute to tissue damage within the first hours.¹⁵⁴ TREM-1 inhibition reduces ROS release in various inflammatory conditions and could thus limit RI through this mechanism.

Strengths

This work has several important strengths. First, we used adult minipigs. Although much more expensive than usual domestic pigs, these animals are physiologically close to adult humans and are well accepted by the scientific community for preclinical cardiovascular research. Second, we used a clinically relevant low-invasive closed-chest AMI model and we tried to mimic what could be the use of this therapy if administered to humans (administration just before reperfusion). Third, we designed this study as a randomized and blinded one, therefore limiting experimental biases. Fourth, experienced intensive care physicians conducted resuscitation throughout the study period.

Limits

Nevertheless, several controversial points deserve discussion. Despite several consistent data sets obtained by different devices and techniques showing a beneficial effect of LR12 treatment, we could not find any significant change of ESPVR, whether between- or within-group. This could be explained by an offset of the volume intercept V_0 throughout the study period, a phenomenon previously reported in a similar model evaluating PV loops-derived parameters during cardiogenic shock in pigs.¹⁴³ In the same way, we could not find any difference in “dP/dtmax to EDV” relationship, another load-independent contractility index. This parameter has also been previously reported less reliable than PRSW.¹⁵⁵ In our study, some issues could explain this result: an offset of volume intercept or a significant

increase in heart rate in control animals. We collected many hemodynamic data, so this study is mostly descriptive. Further investigations are required to evaluate mechanistic insights raised in the previous paragraphs. Finally, the length of the study period was short in comparison with the whole process of leukocytes recruitment. Indeed, ischemic myocardium sequentially recruits various leukocytes subsets in a well-compartmentalized reaction over the first week. However, whether a late therapeutic window to limit RI exists is not known and the current paradigm suggests that cardiomyocytes death mostly occurs quickly after blood flow restoration.¹³²

Conclusion

The inhibition of the TREM-1 pathway by the synthetic peptide LR12 was able to limit myocardial reperfusion injury in a clinically relevant model of AMI. Although further studies are needed to decipher the precise mechanism of action of this treatment, this new promising strategy could be investigated in humans in the future.

Conclusion

Au cours de l'évolution phylogénétique, une pression de sélection s'est exercée sur le développement d'une réponse immunitaire puissante permettant la protection des surfaces cutanées et muqueuses vis-à-vis du risque infectieux bactérien. Chez les rares espèces qui y sont susceptibles, la survenue tardive d'une maladie cardiovasculaire, après l'âge de la reproduction, n'impose pas de pression d'évolution sur le système immunitaire. La réaction immunitaire qui se met en place dans l'environnement stérile cardiaque après infarctus est donc vraisemblablement « surdimensionnée », ce constat étant désormais appuyé par trois décennies de recherche expérimentale suggérant un rôle potentiellement délétère d'une réponse inflammatoire insuffisamment contenue dans le temps, dans l'espace et dans son intensité. Cependant, l'inhibition complète de la réponse immunitaire n'est pas la solution adéquate puisqu'elle empêche le nettoyage des débris cellulaires et matriciels ainsi que la formation d'une cicatrice certes non contractile mais résistante au régime de pression auquel est continuellement soumis le tissu cardiaque.

TREM-1 est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines, dont l'activation aboutit à l'amplification de la réponse immunitaire innée suite à la reconnaissance de molécules de danger et/ou de motifs microbiens. La modulation de la voie de signalisation de TREM-1 n'entraîne donc pas une inhibition complète de la réponse inflammatoire, mais limite l'intensité de cette réponse. Il nous est donc apparu intéressant d'évaluer le rôle de TREM-1 et l'intérêt thérapeutique de sa modulation au cours de l'infarctus du myocarde.

A travers différents modèles expérimentaux, nous avons documenté le rôle primordial de TREM-1 au cours de la réponse inflammatoire post-infarctus, notamment en ce qui concerne le recrutement de l'infiltrat leucocytaire myocardique et l'intensité de l'activité protéasique et inflammatoire. Nous avons mis en évidence l'intérêt thérapeutique de la modulation de TREM-1, chez la souris, mais aussi dans un modèle expérimental porcin très proche de la pathologie humaine. Enfin, chez l'Homme, grâce à une cohorte de plus de 1000 patients, nous avons constaté l'existence d'une association entre l'activation de TREM-1 et la survenue de complications et de décès dans les suites d'un infarctus du myocarde, apportant une confirmation supplémentaire de l'importance de TREM-1 au cours de cette pathologie.

Perspectives

L'athérosclérose, longtemps considérée comme un problème d'accumulation lipidique, apparaît désormais comme une pathologie inflammatoire chronique de la paroi vasculaire, qui précède la survenue de complications vasculaires telles que l'infarctus du myocarde ou les atteintes cérébrovasculaires. Une réponse immunitaire mettant en jeu les mêmes effecteurs cellulaires que lors de l'infarctus, notamment les neutrophiles et les monocytes/macrophages, persiste au niveau de la paroi artérielle, et aboutit au développement de plaques athéromateuses. La modulation de la réponse immunitaire innée apparaît de plus en plus clairement comme une approche thérapeutique innovante pour limiter le développement de l'athérosclérose et ses complications.

Nous avons vu précédemment que la modulation aiguë de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde était bénéfique. Ces traitements courts (5 jours dans le modèle murin et 18h dans le modèle porcin) permettent notamment une diminution de la taille de la zone infarctée. Cependant, le remodelage ventriculaire est un processus continu, évoluant sur plusieurs mois voire années chez l'Homme. La persistance d'une réaction inflammatoire myocardique entraîne des modifications moléculaires, cellulaires et structurelles définitives du muscle cardiaque. De nouveau, une modulation de cette réponse immunitaire pourrait limiter la survenue d'une telle situation.

Toutefois, la modulation au long cours de TREM-1 afin de limiter le développement de l'athérosclérose ou le remodelage ventriculaire, nécessite une amélioration galénique. La formulation actuelle du peptide LR12 ne rend pas propice son utilisation pour le traitement de pathologies chroniques, sa demi-vie étant très courte. Une stabilisation du peptide apparaît indispensable. Son encapsulation dans un implant est une des pistes actuellement explorées. Brièvement, le peptide est mélangé à un couple polymère/solvant dont la particularité est de passer de l'état liquide à solide après injection (généralement sous-cutanée). La libération du peptide est liée à l'érosion progressive de la matrice de polymère. Nous avons mis au point différents implants peptidiques en collaboration avec une équipe de pharmacologie, que nous nous proposons de tester dans nos modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde.

Références

1. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 1989. p. 1–13.
2. Medzhitov R, others. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:135–145.
3. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C, others. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 1985;42:779.
4. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Toll Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*. 1996;86:973–983.
5. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–397.
6. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:279–289.
7. Arumugam TV, Okun E, Tang S-C, Thundiyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2009;32:4–16.
8. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol*. 2006;7:1266–1273.
9. Allcock RJN, Barrow AD, Forbes S, Beck S, Trowsdale J. The human TREM gene cluster at 6p21. 1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol*. 2003;33:567–577.
10. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000;164:4991–4995.
11. Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett*. 2008;116:111–116.
12. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *nature*. 2001;410:1103–1107.
13. Gibot S, Massin F, Le Renard P, B?n?? MC, Faure GC, Bollaert P-E, Levy B. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33:1787–1793.
14. Kelker MS, Foss TR, Peti W, Teyton L, Kelly JW, Wüthrich K, Wilson IA. Crystal Structure of Human Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J Mol Biol*. 2004;342:1237–1248.
15. Wong-Baeza I, Gonz'alez-Rold'an N, Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Aduna-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Astudillo-de la Vega H, Villasis-Keever MA, Torres-Gonz'alez R, Estrada-Garc'ia I, others. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clin Exp Immunol*. 2006;145:448–455.
16. Washington AV, Gibot S, Acevedo I, Gattis J, Quigley L, Feltz R, De La Mota A, Schubert RL, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, others. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009;119:1489.
17. Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, Massin F, Max JP, Ford J, Alauzet C, others. Soluble Trem-like Transcript-1 Regulates Leukocyte Activation and Controls Microbial Sepsis. *J Immunol*. 2012;188:5585–5592.

18. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J*. 2014;35:2950–2959.
19. Sobel BE, Bresnahan GF, Shell WE, Yoder RD. Estimation of Infarct Size in Man and its Relation to Prognosis. *Circulation*. 1972;46:640–648.
20. Puymirat E, Simon T, Steg PG, Schiele F, Guéret P, Blanchard D, Khalife K, Goldstein P, Cattan S, Vaur L, Cambou J-P, Ferrières J, Danchin N, USIK USIC 2000 Investigators, FAST MI Investigators. Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*. 2012;308:998–1006.
21. Hall MJ, Levant S, DeFrances CJ. Hospitalization for congestive heart failure: United States, 2000–2010. *NCHS Data Brief*. 2012;1–8.
22. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121.
23. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
24. Scarabelli TM, Gottlieb RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death Differ*. 2004;11:S144–S152.
25. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit J-F, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M. Postconditioning the Human Heart. *Circulation*. 2005;112:2143–2148.
26. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1988;263:1353–1357.
27. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J*. 2003;17:2202–2208.
28. Coquerel D, Tamion F. Ischémie-reperfusion myocardique — Aspects physiopathologiques. *Réanimation*. 2010;20:267–273.
29. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569–582.
30. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1988;78:186–201.
31. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev*. 2011;16:13–21.
32. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1907–1939.
33. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63:185–195.
34. Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JPM, Daemen M, Smits JFM. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:75–82.
35. Cleutjens JP. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res*. 1996;32:816–821.
36. Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res*. 1998;38:545–548.
37. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail*. 2002;8:S319–325.

38. Spinale FG. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol Rev.* 2007;87:1285–1342.
39. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AM, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2005;66:520–529.
40. Long CS. The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:81–94.
41. García RA, Brown KL, Pavelec RS, Go KV, Covell JW, Villarreal FJ. Abnormal cardiac wall motion and early matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1080–1087.
42. Philip S, Kundu GC. 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.* 2003;278:14487–14497.
43. Yang Z, Kyriakides TR, 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.* 2000;11:3353–3364.
44. Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem.* 2001;276:38502–38510.
45. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest.* 1998;102:2002–2010.
46. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem.* 1996;155:13–21.
47. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nübe O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med.* 1999;5:1135–1142.
48. Wilson EM, Moainie SL, Baskin JM, Lowry AS, Deschamps AM, Mukherjee R, Guy TS, St John-Sutton MG, Gorman JH, Edmunds LH, Gorman RC, Spinale FG. Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation.* 2003;107:2857–2863.
49. Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, Lowry AS, Escobar GP, Lucas DG, Yarbrough WM, Zile MR, Spinale FG. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation.* 2003;107:618–625.
50. Apple KA, Yarbrough WM, Mukherjee R, Deschamps AM, Escobar PG, Mingoia JT, Sample JA, Hendrick JW, Dowdy KB, McLean JE, Stroud RE, O'Neill TP, Spinale FG. Selective targeting of matrix metalloproteinase inhibition in post-infarction myocardial remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47:228–235.
51. Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, Brum J, Cusmano L, Krzeski P, Lyon R, Quinones M, Theroux P, Sydowski D, Kim HE, Garcia MJ, Jaber WA, Weaver WD. 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.

52. Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee H-M, Golub LM. 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.* 2004;24:733–738.
53. Yang J, Liu Y, Fan X, Li Z, Cheng Y. A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling. *Heart Fail Rev.* 2014;19:799–814.
54. Busatto VC, Cunha V, Cicilini MA, Mill JG. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 1999;32:355–360.
55. Doughty RN, Whalley GA, Walsh HA, Gamble GD, López-Sendón J, Sharpe N, others. Effects of Carvedilol on Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction The CAPRICORN Echo Substudy. *Circulation.* 2004;109:201–206.
56. Groenning BA, Nilsson JC, Sondergaard L, Fritz-Hansen T, Larsson HBW, Hildebrandt PR. Antiremodeling effects on the left ventricle during beta-blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2072–2080.
57. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuée J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular Cardiac Matrix Biomarkers in Patients With Acute Myocardial Infarction Complicated by Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Insights From the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study. *Circulation.* 2009;119:2471–2479.
58. Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, Udelson JE, Melin J, Stewart D, Dolan N, Edens TR, Ahn S, Kinan D. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. *Circulation.* 1992;86:431–438.
59. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, others. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study: the RESOLVD pilot study investigators. *Circulation.* 1999;100:1056–1064.
60. Chan AKY, Sanderson JE, Wang T, Lam W, Yip G, Wang M, Lam YY, Zhang Y, Yeung L, Wu EB, others. Aldosterone receptor antagonism induces reverse remodeling when added to angiotensin receptor blockade in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:591–596.
61. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, others. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012;33:1787–1847.
62. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012;110:159–173.
63. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, Buss S, Autschbach F, Pleger ST, Lukic IK, Bea F, Hardt SE, Humpert PM, Bianchi ME, Mairbörl H, Nawroth PP, Remppis A, Katus HA, Bierhaus A. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation.* 2008;117:3216–3226.
64. Timmers L, Pasterkamp G, Hoog VC de, Arslan F, Appelman Y, Kleijn DPV de. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res.* 2012;94:276–283.
65. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 2001;104:1413–1418.

66. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*. 1990;249:146–151.
67. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1456–1462.
68. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. *Int J Exp Pathol*. 2009;90:621–629.
69. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF- κ B in the Heart. *Circ Res*. 2011;108:1122–1132.
70. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:19725–19730.
71. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S 'ichiro, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123:594–604.
72. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1998;98:699–710.
73. Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan Y-T, Prabhu SD. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor- κ B and inflammatory activation. *Circulation*. 2009;119:1386–1397.
74. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S414–427.
75. Hilfiker-Kleiner D, Shukla P, Klein G, Schaefer A, Stapel B, Hoch M, Müller W, Scherr M, Theilmeier G, Ernst M, Hilfiker A, Drexler H. Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation*. 2010;122:145–155.
76. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008;58:88–111.
77. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1993–2000.
78. Ng LL, Khan SQ, Narayan H, Quinn P, Squire IB, Davies JE. Proteinase 3 and prognosis of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2011;120:231–238.
79. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, De Meyer SF, Gallant M, Erpenbeck L, Brill A, Wang Y, Wagner DD. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*. 2014;123:141–148.
80. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost JTH*. 2014;12:2074–2088.
81. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:427–439.

82. Huang M, Yang D, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev.* 2015;20:25–38.
83. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbato R, Kim JK, Ueno T, Nahrendorf M, Yun SH. Endoscopic Time-Lapse Imaging of Immune Cells in Infarcted Mouse Hearts. *Circ Res.* 2013;112:891–899.
84. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science.* 2013;339:161–166.
85. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204:3037–3047.
86. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009;325:612–616.
87. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2014;102:240–248.
88. Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 2011;32:57–65.
89. Shinagawa H, Frantz S. Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages. *Curr Heart Fail Rep.* 2015;12:247–254.
90. Hilgendorf I, Gerhardt LMS, Tan TC, Winter C, Holderried TAW, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2014;114:1611–1622.
91. Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;116:354–367.
92. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, Dumeau E, Kotti S, Bruneval P, Charo IF, Binder CJ, Danchin N, Tedgui A, Tedder TF, Silvestre J-S, Mallat Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med.* 2013;19:1273–1280.
93. Yang Z, Day Y-J, Toufektsian M-C, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation.* 2006;114:2056–2064.
94. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2012;125:1652–1663.
95. Weirather J, Hofmann U, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Foxp3+CD4+ T Cells Improve Healing after Myocardial Infarction by Modulating Monocyte/Macrophage Differentiation. *Circ Res.* 2014;CIRCRESAHA.114.303895.
96. Hiebert PR, Wu D, Granville DJ. Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice. *Cell Death Differ.* 2013;20:1404–1414.
97. Kondo H, Hojo Y, Tsuru R, Nishimura Y, Shimizu H, Takahashi N, Hirose M, Ikemoto T, Ohya K-I, Katsuki T, Yashiro T, Shimada K. Elevation of plasma granzyme B levels after acute myocardial infarction. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2009;73:503–507.

98. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, Battler A, Eldar M, Hasin D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2141–2149.
99. Wan E, Yeap XY, Dehn S, Terry R, Novak M, Zhang S, Iwata S, Han X, Homma S, Drosatos K, Lomasney J, Engman DM, Miller SD, Vaughan DE, Morrow JP, Kishore R, Thorp EB. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ Res.* 2013;113:1004–1012.
100. Saxena A, Dobaczewski M, Rai V, Haque Z, Chen W, Li N, Frangogiannis NG. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307:H1233–1242.
101. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res.* 2004;64:526–535.
102. Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Korf-Klingebiel M, Napp LC, Hansen B, Kanwischer A, Bavendiek U, Beutel G, Hapke M, Sauer MG, Laudanna C, Hogg N, Vestweber D, Wollert KC. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med.* 2011;17:581–588.
103. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, Récalde A, Zouggar Y, Yin KYHW, Bruneval P, Renault G, Marchiol C, Bonnin P, Lévy B, Bonecchi R, Locati M, Combadière C, Silvestre J-S. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2206–2213.
104. Chen W, Saxena A, Li N, Sun J, Gupta A, Lee D-W, Tian Q, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2598–2608.
105. Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:1593–1603.
106. Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, Lambrew CT, Dykstra G, Palmeri ST, Gibbons RJ, Borzak S, Sobel BE, Gourelay SG, others. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:2778–2783.
107. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1199–1204.
108. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzyllo W, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Mojcik CF, Todaro TG, others. Effect of Pexelizumab, an Anti-C5 Complement Antibody, as Adjunctive Therapy to Fibrinolysis in Acute Myocardial Infarction The COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) Trial. *Circulation.* 2003;108:1176–1183.
109. Granger CB, Mahaffey KW, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Rollins S, Todaro TG, Nicolau JC, Ruzyllo W, others. Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003;108:1184–1190.

110. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes Jr D, O'Neill WW, Todaro TG, Vahanian A, Van de Werf F, others. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA J Am Med Assoc.* 2007;297:43.
111. 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.
112. 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.
113. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1797–H1818.
114. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30:240–245.
115. Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA., Keogh B, McGuirk P, Timmers L, Tersteeg C, Hoefer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, others. Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Is Mediated by Leukocytic Toll-Like Receptor-2 and Reduced by Systemic Administration of a Novel Anti-Toll-Like Receptor-2 Antibody. *Circulation.* 2010;121:80–90.
116. Oyama J, Blais Jr C, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *circulation.* 2004;109:784–789.
117. Lefering R, Neugebauer EAM. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med.* 1995;23:1294.
118. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, Margolis B, Kudsk K, Zimmerli W, Anderson P, others. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med.* 2001;29:503.
119. Fisher CJ, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA.* 1994;271:1836–1843.
120. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pacht J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang C-S, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent J-L, ACCESS Study Group. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA.* 2013;309:1154–1162.
121. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. Risk and the Efficacy of Antiinflammatory Agents Retrospective and Confirmatory Studies of Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1197–1205.
122. Derive M, Boufenz A, Bouazza Y, Groubatch F, Alauzet C, Barraud D, Lozniewski A, Leroy P, Tran N, Gibot S. Effects of a TREM-Like Transcript 1-Derived Peptide During Hypodynamic Septic Shock in Pigs: *Shock.* 2013;39:176–182.
123. Frangogiannis NG. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem.* 2006;13:1877–1893.

124. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:255–265.
125. Gibot S, Kolopp-Sarda M-N, Béné M-C, Bollaert P-E, Lozniewski A, Mory F, Levy B, Faure GC. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med.* 2004;200:1419–1426.
126. Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Attenuation of Responses to Endotoxin by the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Inhibitor LR12 in Nonhuman Primate: *Anesthesiology.* 2014;120:935–942.
127. Weber B, Schuster S, Zysset D, Rihs S, Dickgreber N, Schürch C, Riether C, Siegrist M, Schneider C, Pawelski H, Gurzeler U, Ziltener P, Genitsch V, Tacchini-Cottier F, Ochsenbein A, Hofstetter W, Kopf M, Kaufmann T, Oxenius A, Reith W, Saurer L, Mueller C. TREM-1 Deficiency Can Attenuate Disease Severity without Affecting Pathogen Clearance. *PLoS Pathog.* 2014;10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894224/>
128. Klesney-Tait J, Keck K, Li X, Gilfillan S, Otero K, Baruah S, Meyerholz DK, Varga SM, Knudson CJ, Moninger TO, Moreland J, Zabner J, Colonna M. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J Clin Invest.* 2013;123:138–149.
129. Lim P, Moutereau S, Simon T, Gallet R, Probst V, Ferrieres J, Gueret P, Danchin N. Usefulness of fetuin-A and C-reactive protein concentrations for prediction of outcome in acute coronary syndromes (from the French Registry of Acute ST-Elevation Non-ST-Elevation Myocardial Infarction [FAST-MI]). *Am J Cardiol.* 2013;111:31–37.
130. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L, French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360:363–375.
131. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:986–995.
132. Fröhlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J.* 2013;34:1714–1722.
133. Arslan F, de Kleijn DPV, Timmers L, Doevendans PA, Pasterkamp G. Bridging innate immunity and myocardial ischemia/reperfusion injury: the search for therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* 2008;14:1205–1216.
134. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:292–300.
135. Feng Y, Chao W. Toll-like receptors and myocardial inflammation. *Int J Inflamm.* 2011;2011:170352.
136. Gibot S, Alauzet C, Massin F, Sennoune N, Faure GC, Béné M-C, Lozniewski A, Bollaert P-E, Lévy B. Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *J Infect Dis.* 2006;194:975–983.
137. Kamei K, Yasuda T, Ueda T, Qiang F, Takeyama Y, Shiozaki H. Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in experimental severe acute pancreatitis. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci.* 2010;17:305–312.
138. Gibot S, Massin F, Alauzet C, Derive M, Montemont C, Collin S, Fremont S, Levy B. Effects of the TREM 1 pathway modulation during hemorrhagic shock in rats. *Shock Augusta Ga.* 2009;32:633.

139. Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1–expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest*. 2007;117:3097–3106.
140. Collins CE, La DT, Yang H-T, Massin F, Gibot S, Faure G, Stohl W. Elevated synovial expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in patients with septic arthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1768–1774.
141. Bisson C, Massin F, Lefevre PA, Thilly N, Miller N, Gibot S. Increased gingival crevicular fluid levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM) -1 in severe periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2012;39:1141–1148.
142. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1976;53:1204–206.
143. How OJ, Røsner A, Kildal AB, Stenberg TA, Gjessing PF, Hermansen SE, Myrmet T. Dobutamine-norepinephrine, but not vasopressin, restores the ventriculoarterial matching in experimental cardiogenic shock. *Transl Res*. 2010;156:273–281.
144. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, Williams AR, Hare JM. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc*. 2012;7:1479–1496.
145. Fincke R, Hochman JS, Lowe AM, Menon V, Slater JN, Webb JG, LeJemtel TH, Cotter G, SHOCK Investigators. Cardiac power is the strongest hemodynamic correlate of mortality in cardiogenic shock: a report from the SHOCK trial registry. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:340–348.
146. Abbate A, Van Tassel BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, Oddi C, Roberts CS, Melchior RD, Mueller GH, Abouzaki NA, Rengel LR, Varma A, Gambill ML, Falcao RA, Voelkel NF, Dinarello CA, Vetrovec GW. Effects of Interleukin-1 Blockade With Anakinra on Adverse Cardiac Remodeling and Heart Failure After Acute Myocardial Infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) Pilot Study]. *Am J Cardiol*. 2013;111:1394–1400.
147. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJGM. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res*. 2007;74:343–355.
148. Webster NR, Galley HF. Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth*. 2009;103:70–81.
149. Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med Berl Ger*. 2012;90:361–369.
150. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Brownstein BH, Mason PH, Baker HV, Finnerty CC, Jeschke MG, López MC, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Arnoldo B, Xu W, Zhang Y, Calvano SE, McDonald-Smith GP, Schoenfeld DA, Storey JD, Cobb JP, Warren HS, Moldawer LL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Davis RW, Tompkins RG. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208:2581–2590.
151. Jordan JE, Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999;43:860–878.
152. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. 1997;61:647–653.
153. Tavener SA, Long EM, Robbins SM, McRae KM, Van Remmen H, Kubes P. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res*. 2004;95:700–707.

154. Braunersreuther V, Jaquet V. Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:97–114.
155. Blaudszun G, Licker MJ, Morel DR. Preload-adjusted left ventricular dP/dtmax: a sensitive, continuous, load-independent contractility index. *Exp Physiol*. 2013;98:1446–1456.

Résumé

L'infarctus du myocarde reste aujourd'hui une pathologie fréquente et grave, en dépit des progrès thérapeutiques réalisés au cours des deux dernières décennies. Une recherche fondamentale et clinique intense a permis de mieux appréhender le rôle crucial de la réponse immunitaire au cours de cette pathologie. La réponse inflammatoire post-ischémique est ambivalente puisque nécessaire à la détersion de la zone infarctée et à la consolidation de la cicatrice cardiaque, mais également délétère car impliquée dans le remodelage ventriculaire et capable d'augmenter la taille de l'infarctus. TREM-1 est un récepteur amplificateur de la réponse immunitaire innée. Sa modulation pharmacologique par un peptide de synthèse, LR12, permet de limiter l'amplitude de la réponse inflammatoire sans l'inhiber complètement. A travers différents modèles expérimentaux, nous avons pu montrer que la modulation de TREM-1 au cours de l'infarctus est bénéfique en termes de contractilité cardiaque, de taille d'infarctus et de remodelage ventriculaire. Le mécanisme d'action principal passe par les neutrophiles, dont l'infiltration au sein du myocarde infarcté est nettement atténuée. TREM-1 apparaît désormais comme une cible thérapeutique prometteuse dans le combat contre l'infarctus et l'insuffisance cardiaque post-ischémique.

Mots-clés: inflammation, système immunitaire, TREM-1, Infarctus du myocarde, LR12

Abstract

Despite improvements in therapeutic management of acute myocardial infarction, the prevalence of this deadly condition remains high. Intensive research has raised the critical and ambivalent role of immune response after myocardial infarction. Optimal healing requires an inflammatory reaction for debris removal and scar formation, but unrestrained immune response leads to infarct expansion and maladaptive remodeling. TREM-1 is an immune-receptor that acts as an amplifier of the innate immune response. Blockade of TREM-1 activation by a short inhibitory peptide, LR12, protects from inflammatory hyper-responsiveness. Through various experimental models, we show that TREM-1 modulation improves outcome after myocardial infarction (infarct size, heart function, ventricular remodeling), with significant impact on neutrophils recruitment within the myocardium. TREM-1 could constitute a new therapeutic target in the fight against myocardial infarction and post-ischemic heart failure.

Keywords: inflammation, immune system, TREM-1, myocardial infarction, LR12