

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE-SANTÉ-ENVIRONNEMENT »

Thèse

Présentée et soutenue pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ

Mention : Sciences de la vie et de la santé

Par

BOUFENZER Amir

**EFFET PROTECTEUR DE LA MODULATION DE TREM-1 AU
COURS DU SEPSIS ET DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE
EXPERIMENTAL**

Membres du jury:

Rapporteurs :

Pr Fabienne TAMION
Dr Hafid AIT-OUFELLA

PU-PH, HDR, Rouen
MCU-PH, HDR, Paris

Examineurs :

Pr Pierre-Yves MARIE
Dr Tran NGUYEN
Pr Pierre-François LATERRE
Pr Sébastien GIBOT

PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy
MCF, HDR, Université de Lorraine, Nancy
PU-PH, HDR, Université Catholique de Louvain,
Bruxelles
PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE-SANTÉ-ENVIRONNEMENT »

Thèse

Présentée et soutenue pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ

Mention : Sciences de la vie et de la santé

Par

BOUFENZER Amir

**EFFET PROTECTEUR DE LA MODULATION DE TREM-1 AU
COURS DU SEPSIS ET DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE
EXPERIMENTAL**

Membres du jury:

Rapporteurs :

Pr Fabienne TAMION
Dr Hafid AIT-OUFELLA

PU-PH, HDR, Rouen
MCU-PH, HDR, Paris

Examineurs :

Pr Pierre-Yves MARIE
Dr Tran NGUYEN
Pr Pierre-François LATERRE

Pr Sébastien GIBOT

PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy
MCF, HDR, Université de Lorraine, Nancy
PU-PH, HDR, Université Catholique de Louvain,
Bruxelles
PU-PH, HDR, Université de Lorraine, Nancy

REMERCIEMENTS

Cette thèse ne se serait pas déroulée aussi bien sans l'immense soutien de mon directeur de thèse Professeur Sébastien Gibot. Merci de m'avoir transmis ta passion et ton optimisme sans faille, et également pour la qualité de ton encadrement. Merci aussi pour la confiance que tu m'as accordée et que tu m'accordes encore dans la valorisation de ce travail. Je te remercie également pour ce soutien moral dont tu as toujours fait preuve. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, vraiment beaucoup. J'espère en être digne. À ce qui a été fait, et à ce qui reste à faire...

Je remercie le Professeur Bruno Lévy et Professeur Patrick Lacolley pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et permis d'y effectuer ma thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Docteurs Hafid Ait-Oufella et Professeur Fabienne Tamion pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'au Professeur Pierre-Yves Marie et au Docteur Nguyen Tran pour avoir cordialement accepté d'être examinateurs.

Merci à tous les membres du groupe CHOC, qu'ils soient permanents ou qu'ils aient été de passage, pour leur soutien et la bonne ambiance. Je pense entre autres à Chantal, Charlène, Fannie, Frédéric, Khodr, Feng, Narimane.

Merci à Marc, Youcef, Jérémie, Nacira, Nicolas pour leur aide précieuse, pour leur amitié, leur présence, les déjeuners, les soirées et tous les moments agréables passés et à venir ensemble.

Je remercie cordialement les membres de la plate-forme PTIBC IBISA du Bio-pôle de Nancy pour leurs compétences et leurs gentilleses.

Je souhaiterais adresser des remerciements plus particuliers à toute ma famille : Tout d'abord je souhaite dédier cette thèse à la mémoire de mon père, qui a tant fait pour moi et sans qui ce travail de thèse n'aurait peut être pas vu le jour. Je dédie aussi ce travail de thèse à ma mère qui a toujours cru en moi et pour son soutien permanent tout au long de mes années d'études. Je remercie tout mes frères et soeurs qui de par leur soutien au quotidien ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'adresse aussi un grand merci à ma fiancée Nedjoua, pour son soutien sans faille. Je te remercie pour la confiance en moi que tu as eu.

Tous les amis que je n'ai pas cités, vous vous reconnaissez.

CONFERENCES FRANCAISES :

Claude HURIET 2011 : Nancy – Abstract.

Boufenzler A, Sennoun N, Bouaaza Y, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Rôle de TREM-1 dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental

Claude HURIET 2012 : Nancy – Abstract.

Boufenzler A, Sennoun N, Bouaaza Y, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Rôle de TREM-1 dans la dysfonction cardiaque au cours du sepsis expérimental

Claude HURIET 2013 : Nancy – Communication orale (**Prix HURIET**)

Boufenzler A, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Effet protecteur de la modulation de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde expérimental

Journée FR3209 2013 : Nancy – Communication orale

Boufenzler A, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Effet protecteur de la modulation de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde expérimental

CONFERENCES INTERNATIONALES :

Janvier 2011 : SRLF (Société de Réanimation de Langue Française)- Paris : Abstract et Communication orale.

Boufenzler A, Sennoun N, Bouaaza Y, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Rôle de TREM-1 dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental

Septembre 2012 : International Sepsis Forum – Paris- Abstract, poster

Boufenzler A, Sennoun N, Bouaaza Y, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Rôle de TREM-1 dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental

Janvier 2013 : SRLF – Paris : Communication orale.

Boufenzler A, Lemarie J, Derive M, Gibot S.

Effet protecteur de la modulation de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde expérimental

BREVET:

Inhibiting peptides derived from Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) and from TREM-Like transcript-1 (TLT-1) to treat cardiovascular diseases.

Application number: EP12306079.0

PUBLICATIONS:

Derive M, **Boufenzler 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. *J Immunol* 2012

Derive M, **Boufenzler A**, Gibot S. Attenuation of responses to endotoxin by the Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) inhibitor LR12 in the primate. *Anesthesiology*, in press

INDEX

INDEX	1
FIGURES	4
TABLEAUX	5
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
L'INFARCTUS DU MYOCARDE: UNE PATHOLOGIE INFLAMMATOIRE	7
LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET LA RÉPARATION CARDIAQUE AU COURS DE L'IDM	10
<i>Neutrophiles</i>	10
<i>Monocytes</i>	12
<i>Origine des monocytes recrutés au sein du myocarde infarci</i>	14
<i>Macrophages</i>	15
<i>Lymphocytes</i>	15
LE REMODELAGE MYOCARDIQUE POST-INFARCTUS	17
CHOC SEPTIQUE ET INFARCTUS DU MYOCARDE : DES MÉCANISMES INFLAMMATOIRES COMMUNS	21
DÉFAILLANCE VASCULAIRE ET DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE	27
TREM-1 (TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS-1)	32
TREM-1 : STRUCTURE ET FONCTION	33
COMMENT MODULER L'ACTIVATION DE TREM-1 ?	35
EFFETS DE LA MODULATION DE TREM-1 AU COURS DU SEPSIS	36
OBJECTIFS	39
MATERIEL ET METHODES	40
<i>Modèle de sepsis murin par Ligature et Perforation Caecale (CLP)</i>	40
<i>Réactivité vasculaire</i>	41
<i>Isolement des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et hépatiques</i>	42
<i>Modèle d'infarctus du myocarde : ischémie-permanente (IP) chez la souris</i>	42
<i>Modèles d'IDM chez le rat (ischémie permanente et ischémie/reperfusion)</i>	44
<i>Etude en tomoscintigraphie par émission de positons</i>	44
<i>Etude par cathéter de conductance (Millar)</i>	46
<i>Cytométrie en flux</i>	49
<i>PCR quantitative</i>	50
<i>Western Blot</i>	50

<i>Mesure de la concentration des cytokines</i>	50
<i>Zymographie</i>	51
<i>Analyses statistiques</i>	51
RESULTATS	53
LR12 ATTÉNUÉ LA DÉFAILLANCE CARDIO-CIRCULATOIRE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE	53
LR12 AMÉLIORE L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE	54
TREM-1 EST EXPRIMÉ AU NIVEAU DE L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE	57
LR12 MODULE LES SIGNAUX INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DYSFONCTION VASCULAIRE INDUITE PAR LE SEPSIS	58
TREM-1 EST EXPRIMÉ AU NIVEAU DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES PULMONAIRES ET HÉPATIQUES	59
TREM-1 EST EXPRIMÉ DANS LE MYOCARDE ET EST UP-RÉGULÉ DURANT L'ISCHÉMIE CARDIAQUE	62
LR12 AMÉLIORE LA SURVIE DES ANIMAUX APRÈS INFARCTUS DU MYOCARDE	63
EFFET DE LR12 SUR LA TAILLE DE LA ZONE INFARCTÉE	64
TREM-1 RÉGULE LE RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE MYOCARDIQUE	65
LR12 MODULE L'ACTIVATION LEUCOCYTAIRE	66
LR12 DIMINUE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE DANS LES ZONES ISCHÉMIQUES AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE	69
TREM-1 CONTRÔLE LE TRAFIC LEUCOCYTAIRE À DISTANCE	70
LR12 AMÉLIORE LES PARAMÈTRES SYSTOLIQUES ET DIASTOLIQUES APRÈS UNE ISCHÉMIE PERMANENTE MYOCARDIQUE (RAT)	73
LR12 AMÉLIORE LA FONCTION CARDIAQUE APRÈS UNE ISCHÉMIE TRANSITOIRE :	76
DISCUSSION	79
RÉACTIVITÉ VASCULAIRE, DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE & SEPSIS	79
<u>LR12 AMÉLIORE LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE ET RÉDUIT LA LACTATÉMIE ARTÉRIELLE</u>	79
<u>LR12 ATTÉNUÉ L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE INDUITES PAR LE SEPSIS</u>	80
<u>LR12 AMÉLIORE L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE IN VITRO</u>	83
<u>TREM-1 EST EXPRIMÉ PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET EST FONCTIONNEL</u>	83
L'INFARCTUS DU MYOCARDE EST UNE PATHOLOGIE INFLAMMATOIRE	84
<u>INFLAMMATION ET ISCHÉMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE</u>	84
<u>LE REMODELAGE VENTRICULAIRE</u>	86
<u>MÉCANISMES NEUROHORMONAUX</u>	87
<u>INFLAMMATION ET REMODELAGE VENTRICULAIRE</u>	88
<u>Echecs des thérapeutiques anti-inflammatoires</u>	89
Similitudes entre IDM et sepsis	91
RÔLE DE TREM-1 ET DE SA MODULATION AU COURS DE L'IDM	92

<u>TREM-1 EST EXPRIMÉ DANS LE MYOCARDE ET JOUE UN RÔLE DANS LA SURVIE APRÈS UN IDM</u>	92
<u>TREM-1 RÉGULE LE RECRUTEMENT ET L'ACTIVATION LEUCOCYTAIRE</u>	92
<u>LR12 LIMITE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE MYOCARDIQUE APRÈS IDM</u>	93
<u>LR12 LIMITE LE REMODELAGE VENTRICULAIRE ET AMÉLIORE LA FONCTION CARDIAQUE APRÈS INFARCTUS</u>	94
PERSPECTIVES	95
DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE ET MYOCARDIQUE AU COURS DU SEPSIS	95
<u>FONCTION ENDOTHÉLIALE</u>	95
<u>FONCTION MYOCARDIQUE</u>	96
TREM-1 & INFARCTUS DU MYOCARDE	96
<u>IMPLICATION DE TREM-1 AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE</u>	96
<u>L'EFFET PROTECTEUR DE LR12 IMPLIQUE-T-IL LES LYMPHOCYTES</u>	96
<u>INFARCTUS CHEZ LE GROS ANIMAL</u>	97
<u>EFFET DE LA MODULATION DE TREM-1 AU COURS D'AUTRES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES</u>	97
<u>VALORISATION</u>	97
BIBLIOGRAPHIE	98

FIGURES

Figure 1 : Concept de lésions de reperfusion coronaire et cardioprotection	8
Figure 2 : Médiateurs principaux de la mort cellulaire causée par la reperfusion	10
Figure 3 : Le rôle des neutrophiles au cours de l'IDM	11
Figure 4 : La réponse monocytaire après un IM est biphasique chez la souris	13
Figure 5 : Le recrutement et la signalisation des monocytes au cours de l'IDM chez la souris. D'après Swirski FK et al., 2013²³⁸	14
Figure 6 : La signalisation des lymphocytes T CD4+ au cours de l'IDM	16
Figure 7 : Mise en place du remodelage du VG après un IDM	20
Figure 8 : Voies de signalisation simplifiées des TLR	22
Figure 9 : Induction des cascades de signalisation via LPS	22
Figure 10 : Représentation des différents DAMPs ou Alarmines	23
Figure 11 : Effets de TNF-α au cours de l'IDM	25
Figure 12 : Implication de l'IL-6 au cours du remodelage cardiaque post-infarctus	26
Figure 13 : Différents mécanismes participant à la dysfonction vasculaire lors des états septiques	28
Figure 14 : Mécanismes participant à l'altération de la perfusion microvasculaire au cours du sepsis	29
Figure 15 : Voies de signalisation de TREM-1 et DAP12 dans les cellules myéloïdes	34
Figure 16 : LR12 atténue la défaillance cardio-circulatoire au cours du choc septique expérimental (CLP)	54
Figure 17 : LR12 améliore la dysfonction vasculaire induite par le sepsis	56
Figure 18 : TREM-1 est exprimé par les cellules endothéliales de l'aorte thoracique et de l'artère thoracique	57
Figure 19 : LR12 module les signaux intracellulaires impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par le sepsis	59
Figure 20 : TREM-1 est exprimé de manière constitutive et inductible par les LuMEC	61
Figure 21 : Effet de LR12 sur la production de cytokines par les LuMEC en présence de LPS	61
Figure 22 : LR12 module la signalisation intracellulaire des LuMEC induite par le LPS	62
Figure 23 : TREM-1 est exprimé dans le myocarde et est up-régulé durant l'ischémie cardiaque	63
Figure 24 : LR12 améliore la survie au cours de l'IDM	64
Figure 25 : Effet de LR12 sur l'étendue de l'ischémie au cours de l'IDM	64
Figure 26 : LR12 module le recrutement leucocytaire myocardique au cours de l'IDM	65
Figure 27 : Effet de LR12 sur plusieurs voies de signalisation impliquées au cours de l'IDM	67
Figure 28 : Effet de LR12 sur la réponse myocardique génique et protéique	68
Figure 29 : LR12 diminue l'activité protéasique dans les zones ischémiques au cours de l'infarctus du myocarde	69
Figure 31 : Effets de LR12 sur la production de chimiokines et de sTREM-1	71
Figure 30 : TREM-1 contrôle le trafic leucocytaire à distance au cours de l'infarctus du myocarde	71
Figure 32 : Courbes pression-volume obtenues par cathéter de conductance chez deux rats ayant subi une ischémie-reperfusion myocardique.	78

TABLEAUX

Table 1. Ischémie permanente : micro-TEP	73
Table 2. Ischémie permanente : cathéter de conductance	74
Table 3. Ischémie-reperfusion : micro-TEP	76
Table 4. Ischémie-reperfusion : cathéter de conductance	77

ABREVIATIONS

ADP	Adenosine Di-Phosphate	MEC	Matrice Extracellulaire
AKT	Protéine Kinase B	MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
AP-1	Activator Protein 1	MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ATP	Adénosine Triphosphate	MMP	Matrix Metalloproteinase
BCL10	B-Cell Lymphoma/Leukemia 10	MSK	Mitogen and Stress activated protein Kinase
BCR	B-Cell Receptor	MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88)
CARD9	Caspase Recruitment Domain-containing protein 9	NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
CCR-2	C-C chemokine receptor type 2	NF-κB	Nuclear Factor-κ B
CD	Cluster of Differentiation	NLR	NOD-Like Receptor
CDR	Complementary Determining Region	NO	Monoxyde d'azote
CLP	Caecal Ligation and Perforation	NK	Natural Killer
COX	Cyclo-oxygénase	NKp44	Natural Killer cell p44-related Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	OPN	Osteopontin
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1	PAF	Platelet Activating Factor
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
DAP12	DNA activating protein 12	PE	Phycoerythrin
eNOS	endothelial Nitric-Oxide Synthase	PGs	Protéoglycane
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
FGF	Fibroblast growth factors	PKC	Proteine Kinase C
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate	PLC-γ	PhosphoLipase C-γ
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor	PRR	Pattern Recognition Receptor
GP	GlycoProteine	PRR	Prolin Rich Region
GRB2	Growth factor Receptor Binding protein 2	PU.1	Transcription Factor
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR	ROS	Reactive Oxygen Species
HMGB1	High-Mobility Group Box1	SHP	Src Homology containing tyrosine Phosphatases
HSP	Heat-Shock Protein	SHPS-1	SH2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase Substrate-1
ICAM	IntraCellular Adhesion Molecule	SIRS	Syndrôme de Réponse Inflammatoire Systémique
IFN	Interferon	Src	Spleen Tyrosine Kinase
IgG	ImmunoGlobuline G	SRLF	Société de Réanimation de Langue Française
IL	Interleukine	SYK	Spleen tyrosine- kinase
iNOS	Inductible Nitric-Oxide Synthase	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
IDM	Infarctus du Myocarde	TCR	T-Cell Receptor
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase	TGF-β	Transforming Growth Factor-β
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif	TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif	Th	T helper
JE	Mouse monocyte chemoattractant protein-1	TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
KC	Keratinocyte Chemotrattrant	TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinase
KO	Knock Out	TIR	Toll Interleukine 1 Receptor
LBP	LPS Binding Protein	TLR	Toll-Like Receptor
LPS	LipoPolySaccharide	TLT-1	TREM-Like Transcript-1
LRR	Leucine Rich Region	Tregs	T régulateurs
LT	Lymphocytes T	TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1
LTA	LipoTéichoïc Acid	TRIF	TIR domain containing-adaptor inducing IFN-β
MALT1	Mucosal-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1	TSP-1	Thrombospondin
MAMP	Microbial-Associated Molecular Pattern	TXA2	Thromboxane A2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	VEGFR	Vascular endothelial growth factor
MCPs	Monocyte Chemoattractant Proteins	VG	Ventricule Gauche
MD2	Myeloid Differentiation factor2	ZAP-70	ζ-chain-Associated Protein of 70 kDa
MDL-1	Myeloid DAP12-associating Lectin		

INTRODUCTION

L'INFARCTUS DU MYOCARDE: UNE PATHOLOGIE INFLAMMATOIRE

Les maladies cardiovasculaires, notamment l'infarctus du myocarde (IDM), représentent les principales causes de décès dans le monde, et ce malgré l'amélioration de la prise en charge, incluant la revascularisation précoce¹.

Au cours de l'IDM, la nécrose cellulaire est à l'initiative de la mise en place d'une réponse de type inflammatoire au niveau de la zone infarctée. Elle fait appel à l'activation du complément et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui permet l'activation ultérieure d'une cascade de cytokines pro-inflammatoires (interleukines (IL) et Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) entre autres) qui joueront un rôle lors de la reperfusion^{2,3}. Cette inflammation est nécessaire à l'établissement d'un tissu cicatriciel et au processus de guérison.

Dans un second temps, le cœur doit pallier le déficit contractile : il se dilate afin de s'adapter aux nouvelles conditions hémodynamiques⁴. Pour que cette dilatation soit stable et fonctionnelle, la structure même du muscle se modifie, en particulier sa composante matricielle : un processus appelé remodelage ventriculaire myocardique⁵. Ce processus est essentiellement concentré au niveau du ventricule gauche. Un équilibre approprié entre synthèse et dégradation de la matrice est nécessaire pour une morphogénèse normale et le maintien du tissu cicatriciel, ce qui fait du remodelage un mécanisme adaptatif souhaitable. En revanche, si ce processus s'amplifie ou se dérégule, le remodelage est dit mal-adaptatif : il devient alors pathologique et peut engendrer un défaut de contraction et/ou un mauvais remplissage des cavités cardiaques conduisant à l'apparition d'une insuffisance cardiaque^{5,6}.

L'IDM s'accompagne également d'une dysfonction endothéliale en créant une augmentation du stress oxydatif. Cette nouvelle condition est responsable d'une détérioration de la vasorelaxation, d'une prolifération des cellules musculaires lisses, d'une infiltration cellulaire ainsi que d'une réponse inflammatoire^{7,8}.

La taille de l'infarctus est un déterminant majeur du pronostic vital du patient. Elle est dépendante de la durée de l'ischémie, de l'artère touchée, de phénomènes d'occlusions transitoires précédant une occlusion définitive et de l'absence de réseaux de suppléance préalablement développés. La stratégie thérapeutique majeure pour limiter la taille de la nécrose du myocarde et améliorer le pronostic de l'IDM est la reperfusion cardiaque. Son objectif est de permettre la réouverture de l'artère responsable de l'infarctus, principalement en éliminant le thrombus responsable de l'occlusion coronaire et par rétablir le flux sanguin.

Bien qu'au centre de la zone infarctée les cardiomyocytes déjà nécrosés ne puissent être récupérés, le maintien de la circulation sanguine permet de stabiliser la progression de l'infarctus, de prévenir la perte additionnelle de cellules au niveau de ses zones bordantes, de modérer la dilatation du ventricule gauche (VG) et de préserver sa fonction en limitant le processus de remodelage⁹.

Cependant, bien que ce soit la stratégie la plus efficace pour réduire la taille de l'infarctus, la reperfusion est par elle-même associée à des modifications biochimiques, structurales et fonctionnelles supplémentaires qui peuvent amplifier la mort des cardiomyocytes. Ce phénomène, appelé lésion de reperfusion myocardique, peut paradoxalement réduire les effets bénéfiques de la reperfusion¹⁰ (Figure 1 **page 8**):

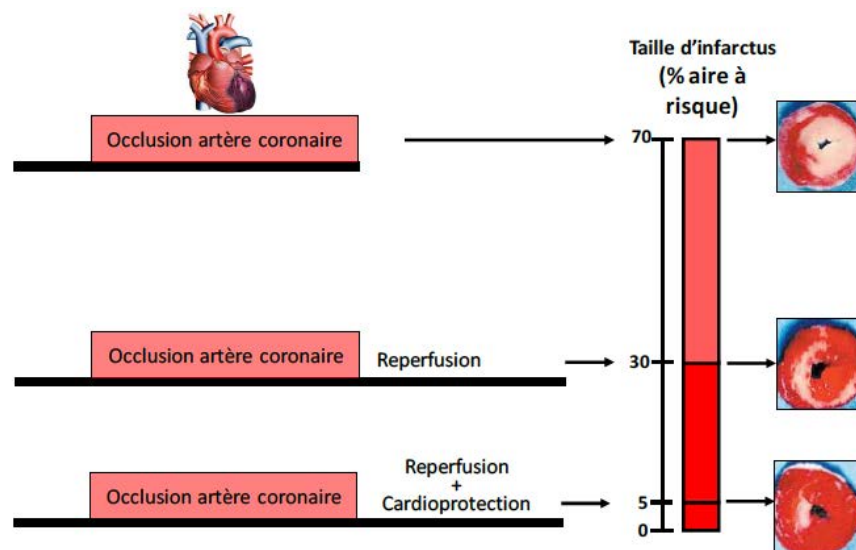


Figure 1 : Concept de lésions de reperfusion coronaire et cardioprotection

Ce schéma représente la réduction de taille d'infarctus obtenue après reperfusion suite à une ischémie. La zone blanche correspond à la zone infarctée alors que la zone colorée en rouge correspond à l'aire à risque. D'après Yellon et al., 2007¹⁰

C'est en 1960 que Jennings a émis l'hypothèse de l'existence de lésions de reperfusion¹¹. La reperfusion s'accompagne parfois 1) d'un phénomène de no-reflow par lequel des altérations de la microcirculation compromettent la restauration du flux sanguin coronaire¹² et engendrent des arythmies de reperfusion, potentiellement à l'origine de mort subite¹³ et 2) de lésions létales de reperfusion entraînant une mort cellulaire.

Après reperfusion, les cellules précédemment ischémiques développent souvent et brutalement des changements ultra-structuraux indiquant la mort cellulaire : un bombement « explosif » et une désorganisation architecturale^{14,15}. Les cellules inflammatoires sont également recrutées en masse pendant la reperfusion et participent aux dommages membranaires par la production de protéases et de radicaux libres.

Les travaux les plus récents sur les mécanismes de cette mort cellulaire insistent sur le rôle déterminant que jouerait l'ouverture d'un pore de transition de perméabilité, au niveau de la membrane mitochondriale, en réponse à l'élévation brutale du calcium mitochondrial et du stress oxydant. Dès le début de la reperfusion, la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP reprennent, causant au moins trois mécanismes délétères au niveau intracellulaire (Figure2 **page 10**) : i) Une surcharge calcique cytosolique puis mitochondriale, consécutive aux mécanismes compensateurs de l'excès de protons, ii) Un stress radicalaire intense correspondant à une production excessive de radicaux libres de l'oxygène par une chaîne respiratoire mitochondriale lésée lors de l'ischémie et brutalement soumise à une ré-oxygénation, iii) une rapide correction de cette acidose, avec même une tendance transitoire à l'alcalose intracellulaire¹⁰.

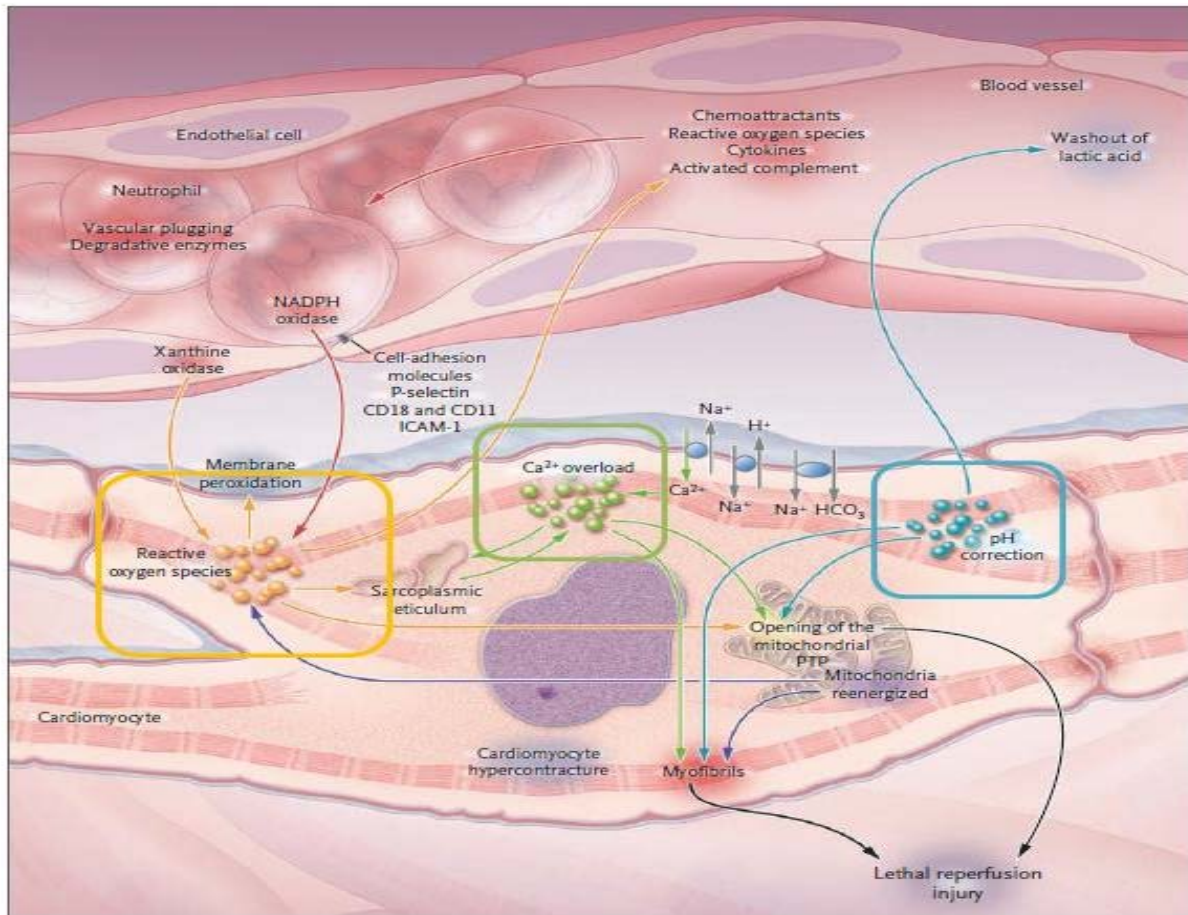


Figure 2 : Médiateurs principaux de la mort cellulaire causée par la reperfusion

Les principaux générateurs de cette mort cellulaire liée à la reperfusion sont le stress oxydant, avec une production de ROS importante, une surcharge calcique et une alcalinisation. D'après Yellon et al., 2007¹⁰

LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET LA RÉPARATION CARDIAQUE AU COURS DE L'IDM

La réponse inflammatoire observée au cours de l'IDM est principalement induite par l'activation des systèmes immunitaires inné et adaptatif, et peut exacerber les dommages tissulaires.

Neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées durant la phase initiale de l'ischémie cardiaque, avec un maximum à 24 heures¹⁶. Le recrutement des neutrophiles dans la zone infarctée provoque un relargage en masse de MMP-9, ce qui peut contribuer à une dégradation excessive de la matrice extracellulaire (MEC) cardiaque et à un remodelage myocardique inadapté^{17,18}.

De plus, les neutrophiles représentent une source de destruction du tissu myocardique car lorsqu'ils s'accumulent, la nécrose myocardique est amplifiée. La fin de l'infiltration des neutrophiles survient environ deux jours après l'infarctus. Ils entrent ensuite en apoptose et sont phagocytés par les macrophages, ce qui marque la fin de la phase inflammatoire précoce de la cicatrisation¹⁹ (Figure 3 **page 11**).

En effet, le mécanisme cellulaire le plus important pour la résolution de l'inflammation est la clairance des cellules apoptotiques dans le tissu ischémié²⁰, un processus actif associé à la suppression de l'inflammation, comme la phagocytose qui ingère les cellules apoptotiques puis libère de grandes quantités de médiateurs inhibiteurs²¹.

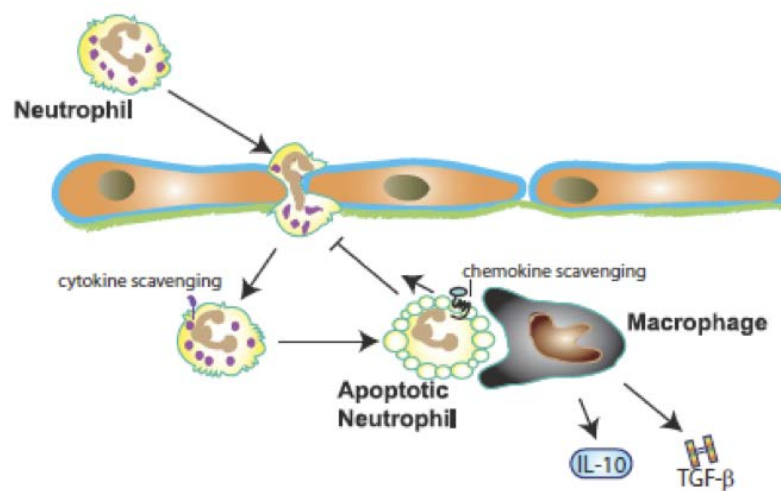


Figure 3 : Le rôle des neutrophiles au cours de l'IDM

D'après Frangogiannis NG et al., 2012¹⁹

Les granulocytes apoptotiques sont capables d'atténuer l'inflammation par deux mécanismes. D'abord en libérant des médiateurs qui inhibent leur recrutement, comme annexine A1 et lactoferrin²². Ces médiateurs agissent également comme agents chimiotactiques pour les cellules phagocytaires, favorisant ainsi la résolution de l'infiltration des neutrophiles.

Deuxièmement, l'absorption des neutrophiles apoptotiques active un programme macrophagique anti-inflammatoire favorisant l'induction et la libération d'IL-10 et de TGF-beta (Transforming Growth Factor)²³. Cependant, les neutrophiles peuvent sécréter des oxydants, des protéases et différents facteurs capables d'amplifier le recrutement des cellules immunitaires.

Les lésions de reperfusion associées aux neutrophiles sont causées par la libération de radicaux libres, de facteurs chimio-attractants, d'enzymes protéolytiques, de produits de l'acide arachidonique et l'obstruction physique de petites artérioles et capillaires (phénomène de non-reperfusion)²⁴.

La déplétion des neutrophiles chez des animaux qui ont subi une ischémie/reperfusion myocardique montre une diminution de la zone infarctée, ce qui suggère clairement un rôle des neutrophiles dans l'ischémie cardiaque²⁵.

Monocytes

Les monocytes représentent la deuxième vague cellulaire à coloniser le tissu de granulation en formation. Présents sous forme de monocytes circulants dans le sang, ils se différencient en macrophages lors de leur infiltration tissulaire.

Les monocytes/macrophages persistent pendant des jours dans la zone ischémique et contribuent à l'inflammation, protéolyse, phagocytose, angiogenèse et à la déposition du collagène^{26,27}. Des fonctions diverses et apparemment contrastées placent le monocyte/macrophage comme un protagoniste cellulaire central et une cible thérapeutique potentielle dans la cicatrisation et la réparation tissulaire^{28,29,30}. En effet, dans un modèle d'ischémie permanente, des données expérimentales ont rapporté une corrélation à la fois négative^{31,32,29} et positive^{16,33,34} entre le nombre de monocytes/macrophages et le processus de cicatrisation/remodelage du VG.

Au cours de l'ischémie, les monocytes/macrophages 1) libèrent des médiateurs inflammatoires tels que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6), interféron et MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Proteins 1 α) ; 2) phagocytent des cellules nécrotiques et apoptotiques ; 3) libèrent des protéases telles que les métallo-protéases (MMP)^{35,36,37} et les cathepsines qui digèrent le réseau de collagène préexistant et facilitent le mouvement cellulaire ; 4) favorisent l'angiogenèse à travers la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de FGF (Fibroblast Growth Factor) ; 5) apportent des enzymes de réparation et des facteurs de survie comme les transglutaminases ; 6) stimulent la synthèse et la déposition du collagène par les myofibroblastes *via* la libération du TGF- β et FGF .

Dans le sang, les monocytes constituent un pool hétérogène. Chez la souris, il existe deux sous-populations dont les monocytes Ly-C6^{high} (Gr1^{high} CCR2⁺CX3CR1^{low}) représentant à peu près 50 à 60% à l'état stationnaire. Ce type de monocytes s'infiltrent efficacement dans

les sites inflammatoires via CCR-2 (C-C chemokine Receptor type 2) et se transforment en macrophages et cellules dendritiques^{38,39,40,41}.

Cette sous-classe de monocyte est la première recrutée et favorise l'inflammation et l'élimination des débris cellulaires. A l'opposé, les monocytes Ly-6C^{low} (Gr1^{low}CCR2-CX3CR^{high}) s'accumulent moins dans les sites inflammatoires et donnent naissance aux macrophages résidents *via* CX3CR1 (CX3C chemokine Receptor 1). Elles produisent de l'IL-10 et du TGF- β . Cette sous-population est très importante dans la phase proliférative en atténuant l'inflammation et en favorisant la réparation tissulaire⁴² (Figure 4 **page 13**).

Les deux sous-types de monocytes libèrent différentes chimiokines et réagissent aussi différemment selon la chimiokine libérée par la zone ischémique.

Tout d'abord, Les monocytes s'infiltrent dans le myocarde en suivant un gradient de protéines chimio-attractives comme la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), *via* l'activation du récepteur aux chimiokines CCR-2; ils se différencient alors en macrophages et s'accumulent dans la zone lésée^{42,28}. Une fois recrutés, les sous-types de monocytes expriment des médiateurs différents: les monocytes Ly-6C^{high} expriment TFN- α , IL-1 β , des MMPs, et des cathepsines ; les monocytes Ly-6C^{low} expriment IL-10, TGF- β , VEGF qui sont des facteurs pro-angiogéniques et impliqués dans la réparation.

Les propriétés biologiques de ces deux sous-types de monocytes et leur recrutement séquentiel au cours d'un IDM sont bien corrélés avec l'évolution de la cicatrisation au cours du temps. En clinique, les patients qui ont subi un infarctus du myocarde montrent une réponse bi-phasique similaire à celle observée chez la souris⁴³ (Figure 5 **page 14**).

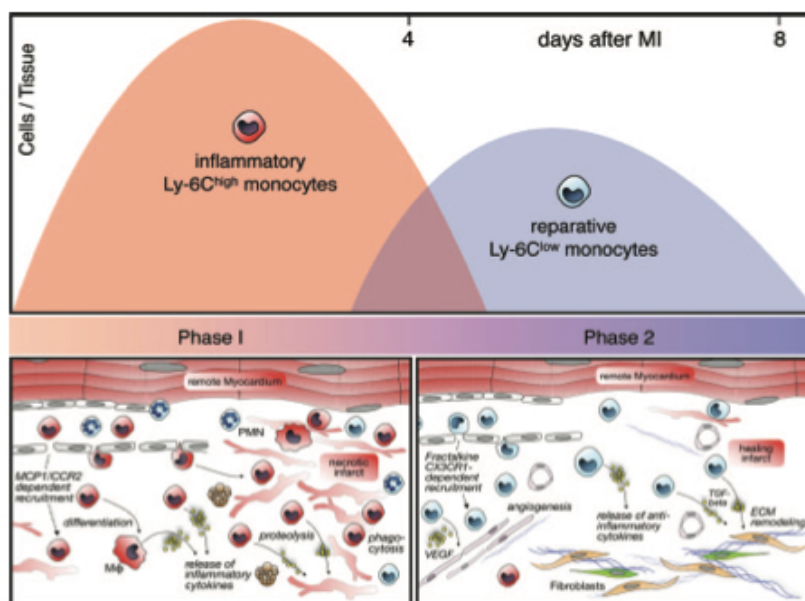


Figure 4 : La réponse monocytaire après un IM est biphasique chez la souris

PMN (polynucléaire neutrophile); M (macrophage); and ECM (matrice extracellulaire). D'après Nahrendorf M et al., 2010⁴³

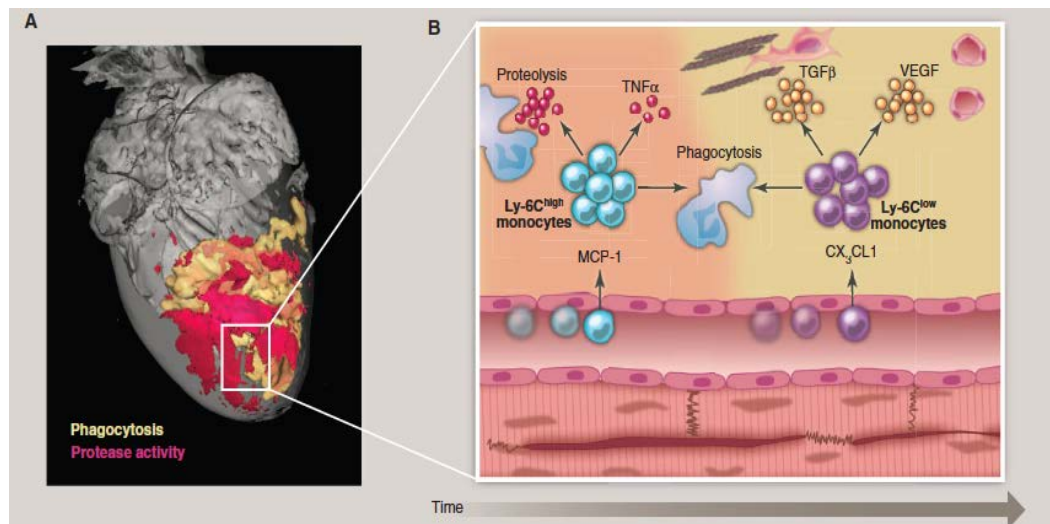


Figure 5: Le recrutement et la signalisation des monocytes au cours de l'IDM chez la souris. D'après Swirski FK et al., 2013²³⁸

Origine des monocytes recrutés au sein du myocarde infarci

Le paradigme prévalent était que les monocytes étaient formés et stockés dans la moelle osseuse et mobilisés vers la circulation sanguine, puis vers le site ischémique après un stimulus inflammatoire. L'existence d'un important réservoir de monocytes dans la rate a été récemment mise en évidence. L'induction d'un infarctus du myocarde entraîne la mobilisation rapide de ce réservoir de monocytes depuis la rate vers le sang circulant après l'événement ischémique.

Après un infarctus, les monocytes Ly-6C^{high} sont les premiers à infiltrer le tissu cardiaque endommagé et contribuent à la fragmentation et au recyclage des tissus nécrotiques et apoptotiques. Les monocytes Ly-6C^{low} arrivent plus tard pour promouvoir la revascularisation et le dépôt de collagène⁴⁴.

Wirski et ses collaborateurs, alors qu'ils travaillaient sur les processus de réparation du tissu cardiaque ischémique, remarquèrent une accumulation de monocytes Ly-6C^{high} en quantité excédant le nombre de monocytes de la circulation générale³⁴. Ils ont donc cherché à identifier les tissus d'où pouvaient potentiellement provenir ces monocytes en comparant leurs protéines de surface avec ceux des autres organes. La rate fut le seul organe où ces monocytes étaient présents en forte quantité, au niveau de la zone marginale et de la pulpe rouge sous-capsulaire.

La capacité de mobilisation de ces monocytes spléniques a été évaluée dans un modèle murin d'ischémie coronarienne. Durant la période de récupération de cette atteinte expérimentale, le décompte total des monocytes révéla une perte dans la rate et un gain dans le sang et dans le tissu myocardique. Cette migration des monocytes spléniques est induite par l'angiotensine II et contribue significativement à la régénération du tissu cardiaque endommagé³⁴.

Macrophages

Deux sous-types de macrophages peuvent être distingués selon certains marqueurs et certains critères fonctionnels : la population M1 est caractérisée par l'expression de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) et de cytokines pro-inflammatoires (TFN- α , IL-6, IL-1 β), alors que la population M2 exprime fortement l'arginase 1, le VEGF, et des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10. Au cours de l'infarctus du myocarde, les macrophages de type M1 sont présents immédiatement après l'ischémie alors qu'à des temps plus tardifs, les macrophages de profil M2 sont prépondérants⁴⁵; cette chronologie semble correspondre aux cinétiques d'infiltration différentes des deux sous-types monocytaires. Ces différentes études indiquent donc que l'infiltration monocyttaire ainsi que la polarisation des macrophages dans la zone ischémique est bi-phasique. Durant la phase de résolution, les macrophages phagocytent les neutrophiles apoptotiques et peuvent acquérir un phénotype régulateur, exprimant des médiateurs inhibiteurs, et promouvoir la suppression de la réponse inflammatoire.

Les macrophages sont d'une part capables de produire une vaste gamme de facteurs de croissance et de cytokines qui stimulent la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales, et d'autre part sont impliqués dans la phagocytose et l'élimination des débris⁴⁶, l'angiogenèse⁴⁷, et la cicatrisation^{48,49}.

Lymphocytes

Plusieurs études cliniques démontrent une activation des lymphocytes T (LT) chez des patients atteints d'IDM^{50,51}.

L'équipe de Ulrich Hofmann a montré qu'une activation des LT CD4⁺ (Cluster de Différenciation) était nécessaire pour la cicatrisation et le remodelage cardiaque dans un

modèle d'IDM expérimental chez la souris^{52,53}. En effet, une déplétion des lymphocytes CD4⁺ module le recrutement des cellules immunitaires dans la zone infarctée, retarde la transition des monocytes Ly-6C^{high} vers Ly-6C^{low} et induit un remodelage défectueux du VG. Une telle activation lymphocytaire de type CD4⁺ avec un déséquilibre fonctionnel du ratio Th1/Th2 vers Th1 a également été constaté chez l'homme⁵⁴. En revanche, la contribution et la pertinence des lymphocytes T CD4⁺ dans la cicatrisation et le remodelage cardiaque sont peu connues (Figure 6 **page 16**).

Les lymphocytes CD8⁺ jouent un rôle délétère du cours du remodelage post-infarctus⁵⁵. Les LT CD8⁺ sont capables d'induire l'apoptose des cellules. Par conséquent, ces cellules sont supposées contribuer au remodelage en promouvant l'apoptose de cardiomyocytes⁵⁵. Les LT CD8⁺ sont activés suite à un infarctus du myocarde et sont capables de reconnaître et tuer des myocytes *in vitro*⁵⁵.

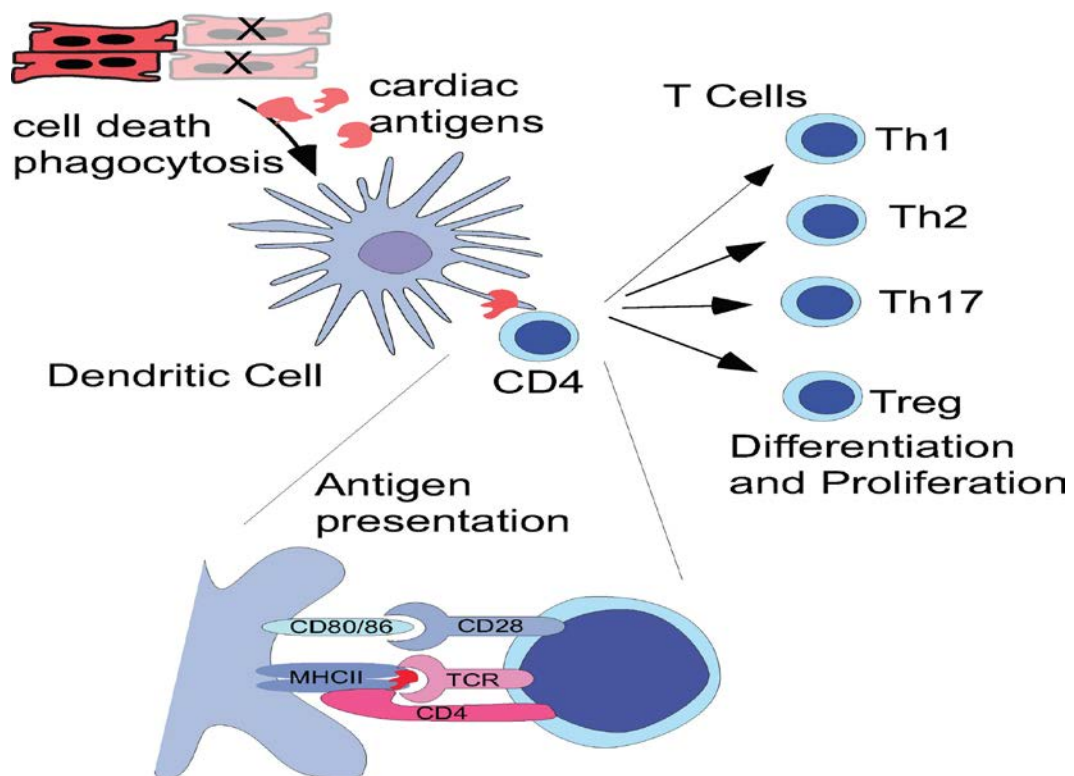


Figure 6 : La signalisation des lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'IDM

Treg : cellules T régulatrices, MHCII, Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II; TCR, Récepteur des Cellules T. D'après Mortsensen RM et al., 2012⁵³

LE REMODELAGE MYOCARDIQUE POST-INFARCTUS

Après un IDM, le cœur va subir des altérations et/ou changements structuraux. Ce processus, appelé remodelage myocardique, principalement localisé au niveau du VG, se met en place au niveau des zones infarctées et non infarctées. Il correspond à une réorganisation structurale de la matrice extracellulaire cardiaque. Le remodelage est un processus long, s'établissant sur plusieurs mois, devant en théorie restaurer la contractilité cardiaque et l'intégrité fonctionnelle du cœur. Les premières observations du phénomène de remodelage ont été d'ordre anatomique puis histologique. Le remodelage myocardique précoce suit l'occlusion coronarienne et son étendue dépend de la taille de la zone infarctée et du temps de reperfusion³⁶. Le remodelage fait également appel à un ensemble de mécanismes interconnectés tels que la mise en place d'une réaction inflammatoire, d'une hypertrophie cardiaque et la formation d'un tissu cicatriciel⁵⁶.

La progression du remodelage est incontestablement la conséquence de modifications de l'expression de nombreux gènes^{57,58} au sein des cellules composant le tissu myocardique. Ce sont essentiellement les gènes impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes dont l'expression augmente.

Ainsi, selon les mécanismes impliqués, le remodelage myocardique peut s'avérer adaptatif ou mal-adaptatif. Adaptatif, s'il contribue à restituer la fonction cardiaque perdue, ainsi qu'un débit sanguin suffisant pour les besoins de l'organisme. Mal-adaptatif, s'il conduit au développement d'une insuffisance cardiaque. Il existe néanmoins un stade intermédiaire où les mécanismes bénéfiques et délétères coexistent: c'est le phénomène d'hypertrophie de compensation. La rupture de cet équilibre, au profit des mécanismes délétères, entraîne une évolution de la maladie vers une décompensation, ce qui induit l'apparition d'une insuffisance cardiaque symptomatique^{6,59}. Le tissu cicatriciel qui remplace la zone infarctée nécrosée après sa détertion présente une fibrose matricielle et perd alors ses propriétés contractiles à cause de la rigidité due à la substitution progressive des cardiomyocytes par des fibroblastes. Les zones non infarctées associées à la fibrose voient les propriétés mécaniques de leurs cardiomyocytes s'altérer car ils subissent le phénomène d'hypertrophie de compensation, dans le but de limiter la dilatation cardiaque⁶⁰. Le remodelage ventriculaire est un processus complexe qui se divise en trois étapes⁶¹. D'abord, **la phase précoce ou inflammatoire**, qui implique différents types cellulaires pendant les sept premiers jours qui suivent l'IDM.

Les plaquettes sanguines, stimulées par les structures matricielles endommagées générées sur le site de la lésion, comme des fragments de collagène ou la thrombine, adhèrent au foyer de la blessure et s'agrègent, puis constituent un caillot sanguin contenant fibrine et fibronectine, formant une matrice provisoire⁶². L'activation des plaquettes sanguines provoque la libération de nombreuses substances ayant un effet vasoconstricteur qui augmente la perméabilité des vaisseaux en périphérie de la zone infarctée, et permet le chimiotactisme des cellules de l'immunité^{63,64}. Les mastocytes semblent être les premières cellules à intervenir après les plaquettes. Ils sont attirés et activés au niveau du foyer de la blessure, et sécrètent des médiateurs stimulant les autres cellules ou participant à la réparation (migration des fibroblastes, activation de la production de collagène...). Ils agissent jusqu'à la reconstitution du tissu lésé, contrairement aux autres types cellulaires qui interviennent transitoirement⁶⁵.

Les neutrophiles libèrent par dégranulation divers médiateurs et enzymes, dont la MMP-9, ce qui peut contribuer à une dégradation excessive de la MEC cardiaque et à un remodelage myocardique inadapté^{17,18}.

L'expression et l'activité des MMPs et des TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinase) pendant la phase inflammatoire varient selon les espèces^{66,67,68}. Chez la souris, la MMP-9 est présente dans sa forme active 24 heures après infarctus et est principalement produite par les neutrophiles et les macrophages^{18,69} ; de plus, le troisième jour, son activité augmente à la fois dans la zone infarctée et la zone bordante⁷⁰. Vers le quatrième jour, l'activité de la MMP-9 décroît ensuite au profit de la MMP-2 qui est majoritairement sécrétée par les fibroblastes, les macrophages activés et les cardiomyocytes. Chez le rat, les niveaux de MMP-2 et -9 sont élevés respectivement dès 24 heures et jusqu'à 16 semaines post-IDM⁶⁷.

Le rat et la souris présentent une augmentation de l'activité de la MMP-1^{67,26} et un accroissement très élevé des ARNm codant pour les TIMP-1 et -2 pendant la phase de cicatrisation précoce^{67,17,71}. Chez le lapin, l'expression de TIMP-1 au niveau protéique est réduite dans la zone infarctée durant les quatre premiers jours suivant l'IDM, puis retourne à son niveau basal⁶⁸.

Ces études sur différents modèles animaux montrent que la rupture de l'équilibre MMPs/TIMPs augmente la dégradation de la MEC pendant la phase inflammatoire, dès les premières heures qui suivent l'infarctus.

Les MMPs-3 et -9, qui sont notamment les premières exprimées, semblent impliquées dans la dégradation de la MEC de la zone infarctée et contribuent au phénomène de remodelage ventriculaire post-IDM^{72,68}.

Le remodelage précoce qui survient entre 7 et 21 jours après IDM et correspond à la formation d'un tissu provisoire, le tissu de granulation. La formation de la cicatrisation repose sur les macrophages, sur le recrutement et la prolifération de fibroblastes qui vont produire un tissu conjonctif lâche, et sur la constitution de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-angiogenèse) permettant de soutenir le métabolisme cellulaire^{65,73}.

Conjointement à la néovascularisation, la formation du tissu de granulation est également caractérisée par la réparation de la matrice extracellulaire et de ses composants cellulaires. Les macrophages et les plaquettes libèrent des médiateurs favorisant la prolifération des fibroblastes ainsi que leur synthèse de collagène (Figure 7 **page 20**).

C'est le phénomène de fibroplasie, durant lequel les fibroblastes en périphérie de la zone infarctée abandonnent leur état de quiescence et adoptent un phénotype leur permettant de migrer dans la matrice provisoire produite lors de l'inflammation^{73,64}. Pour faciliter leur migration, les fibroblastes activés sécrètent des protéases qui dégraderont la matrice de fibrine et de fibronectine. Tout en continuant à dégrader la matrice provisoire, ils commencent à synthétiser une matrice riche en fibronectine et en collagène de type III, qui sera ensuite remplacée par du collagène de type I, augmentant ainsi le ratio collagène de type I sur collagène de type III⁷⁴. Plus la synthèse de la nouvelle matrice progresse, plus les fibroblastes tendent à adopter un phénotype myofibroblastique. Les interactions entre cellules et entre matrice et cellules prennent forme grâce à la fibronectine qui permet aux myofibroblastes de pénétrer au centre de la zone infarctée et de fermer la lésion^{75,76}. Le tissu infarcté nécrosé est alors remplacé par un tissu de granulation provisoire riche en fibronectine, en collagène, en protéoglycane (PG) et en protéines matricielles telles que l'ostéopontine (OPN) et les thrombospondines (TSP) -1 et -2^{77,66}. Pendant la phase de remodelage précoce ou phase de granulation dans des modèles de rongeurs, l'activité des MMP-2 et -9 diminue 7 jours après IDM, néanmoins elle reste élevée jusqu'à deux semaines par rapport au niveau basal^{78,69,71}. En même temps, les myofibroblastes infiltrés prolifèrent et participent à l'augmentation de la synthèse de MMP-2^{67,17,79}. L'expression des ARNm codant pour TIMP-1 et -2 chez le rat reste élevée de 14 à 21 jours dans la zone infarctée, mais pas dans les zones bordantes non infarctées, alors que leur niveau protéique augmente dès deux semaines après infarctus^{67,80,17,71}.

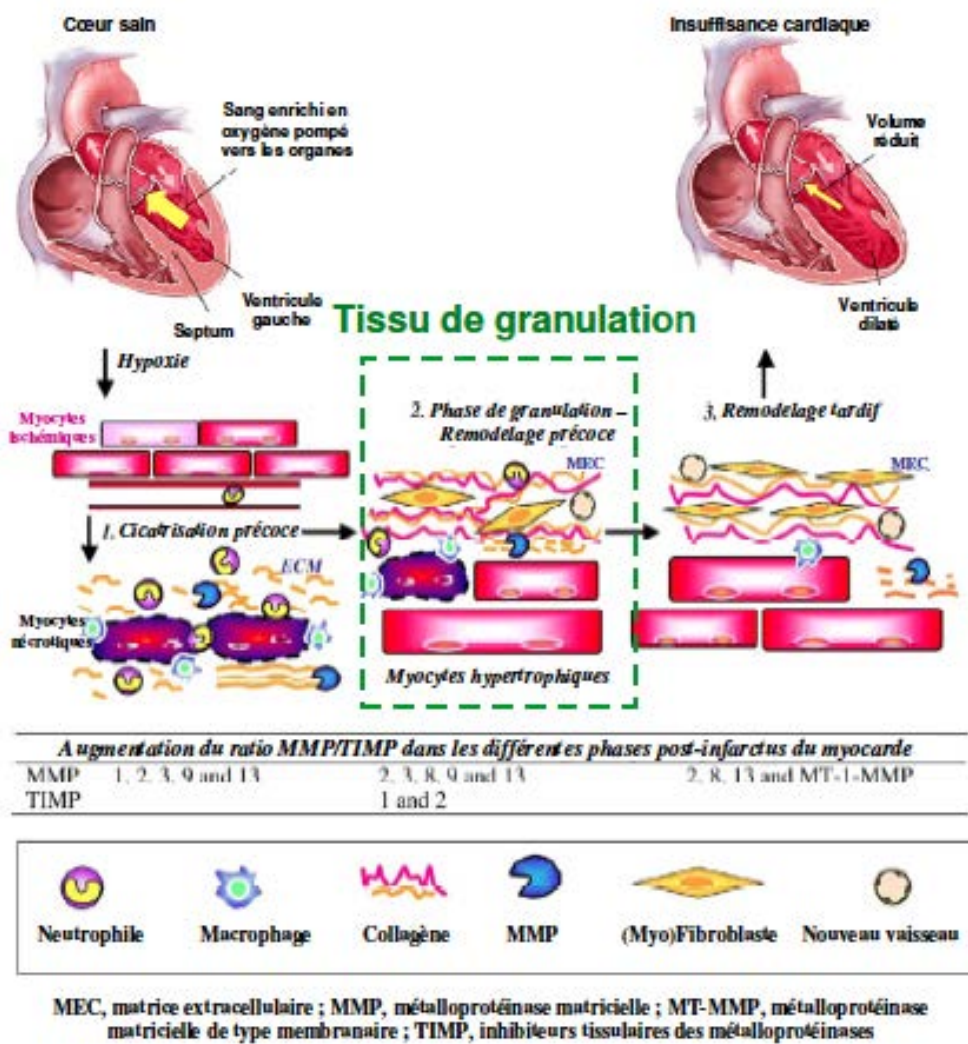


Figure 7 : Mise en place du remodelage du VG après un IDM

D'après Vanhoutte et al., 2006⁵

La phase de granulation laisse place à la phase de **remodelage tardif** qui débute environ 21 jours après un IDM⁵. Les myofibroblastes continuent leur synthèse matricielle pour remplacer le tissu de granulation et le réseau de collagène obtenu présente une meilleure organisation structurale. Le nombre de vaisseaux créés lors de la néo-angiogenèse, ainsi que celui des cellules présentes dans le tissu diminue par apoptose, pour ne laisser qu'un nombre normal de fibroblastes⁸¹. C'est un processus continu qui peut être très long (de quelques semaines à quelques années).

Les MMPs et les TIMPs contribuent en permanence à la synthèse et à la dégradation de la MEC et sont impliqués dans le remodelage chronique du ventricule gauche.

Après la cicatrisation et le remodelage post-IDM, le ventricule gauche subit une dilatation progressive et une altération de sa fonction conduisant au développement d'une insuffisance cardiaque.

CHOC SEPTIQUE ET INFARCTUS DU MYOCARDE : DES MÉCANISMES INFLAMMATOIRES COMMUNS

La réponse immunitaire mise en œuvre au cours du choc septique fait également appel aux cellules de l'immunité innée puis adaptative.

La réponse immunitaire innée (reconnaissance hôte-pathogène) est médiée par les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules expriment des récepteurs cellulaires appelés 'PRRs' (Pattern Recognition Receptors) dont les gènes ne sont pas polymorphes : ils sont tous les mêmes au sein d'une espèce. Ces récepteurs sont exprimés au niveau de différentes cellules : les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les cellules NK (Natural Killer), les polynucléaires, les mastocytes et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires, épithéliales, endothéliales, cardiomyocytes....). Ces récepteurs reconnaissent et fixent des motifs conservés naturellement associés à des pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS), l'acide lipoteichoïque (LTA), le flagelle et l'ADN bactérien. Ces motifs sont connus sous le nom de PAMPs ou MAMPs (Pathogen/Microbial Associated Molecular Patterns).

Parmi les PRR, les TLRs sont des récepteurs transmembranaires contenant un domaine extracellulaire avec des motifs « leucine-rich » répétés, ainsi qu'un domaine intracellulaire nommé TIR (Toll/IL-1 Receptor). La liaison des TLRs à leurs ligands provoque l'activation de kinases et de facteurs de transcription (NFκB par exemple), ce qui conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et d'autres cellules (Figure 8 **page 22**). Suite à l'activation des TLRs, les récepteurs sous forme dimérique vont déclencher un mécanisme de transduction du signal par l'intermédiaire de protéines adaptatrices qui vont activer des kinases intracellulaires capables, à leur tour, d'activer des facteurs de transcription qui vont initier la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme conduit à l'inflammation.

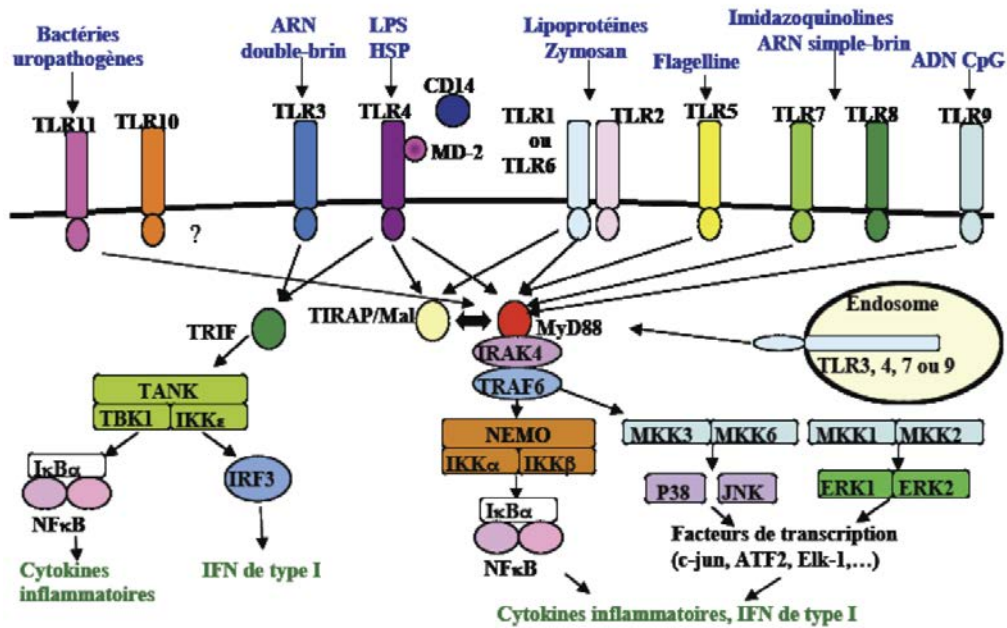


Figure 8 : Voies de signalisation simplifiées des TLR

D'après : Yamamoto et al., 2003; O'Neill and Bowie, 2007

L'endotoxine (ou LPS), constituant de la paroi externe des bactéries Gram (-), active les cellules de l'immunité innée par le biais d'interactions avec TLR4, en présence de molécules co-activatrices indispensables que sont MD2 (Myeloid Differentiation factor 2), LBP (LPS Binding Protein) et CD14⁸² (Figure 9 **page 22**). Les composants de la paroi des bactéries Gram (+), tels que le peptidoglycane ou le LTA, mais aussi le Zymosan des levures, sont reconnus par TLR2.

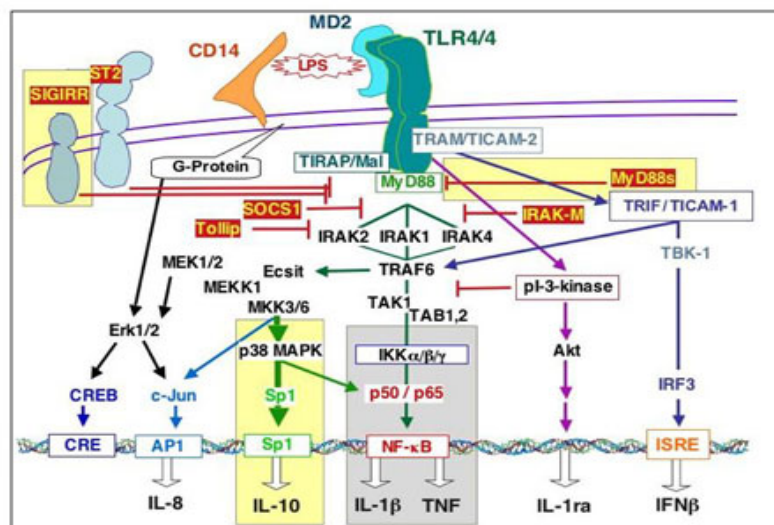


Figure 9 : Induction des cascades de signalisation via LPS

D'après Annane D et al., 2005⁸²

Les TLRs sont également capables de reconnaître des signaux endogènes indicateurs de dommages cellulaires : les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) sont des molécules libérées par les cellules stressées subissant une nécrose qui agissent comme des signaux de danger endogènes capables de promouvoir et d'exacerber la réponse inflammatoire. Les DAMPs peuvent être des défensines, des produits dérivés de l'adénosine tri-phosphate (ATP), de l'acide urique, des protéines de choc thermique (HSP), HMGB1 (High Mobility Group Box-1) (Figure 10 **page 23**). L'augmentation des concentrations sériques de ces DAMPs est associée à de nombreuses maladies inflammatoires : sepsis, arthrite, athérosclérose. Des stratégies thérapeutiques sont d'ailleurs étudiées afin de moduler l'expression de ces DAMPs.

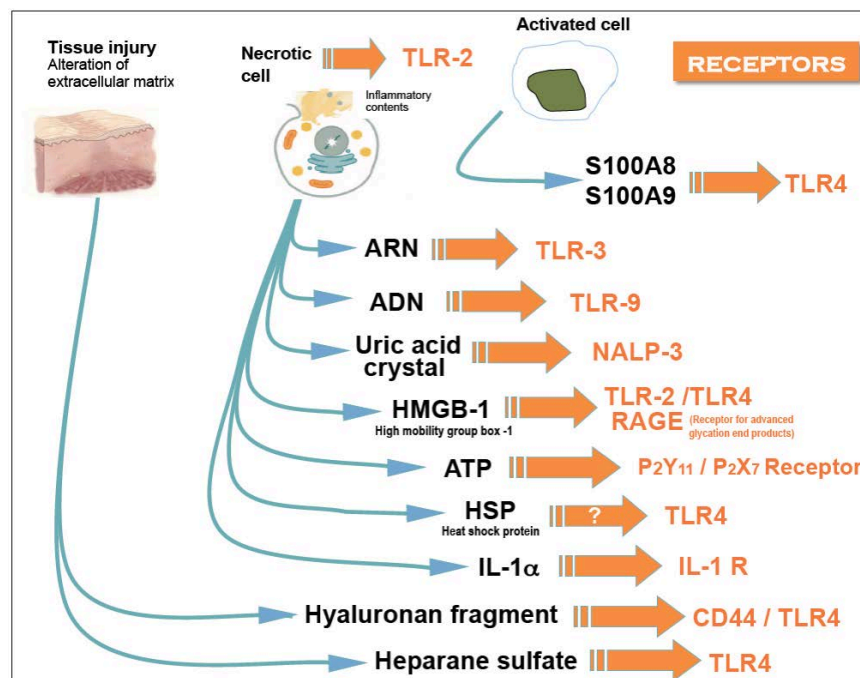


Figure 10 : Représentation des différents DAMPs ou Alarmines

(Assoc. Anciens Elèves Inst. Pasteur 2007, 49: 58)

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, avec en particulier la libération de cytokines pro et anti-inflammatoire.

Ces cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α , sont dites pleïotropiques et sont capables d'induire la production d'autres molécules (médiateurs lipidiques, monoxyde d'azote, radicaux libres de l'oxygène) impliqués dans les dysfonctions d'organes⁸³. Elles peuvent de même induire des phénomènes apoptotiques au niveau des cellules immunitaires et provoquer l'activation des cellules endothéliales (celles-ci exprimant d'autres molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes circulants à l'endothélium, première étape de leur migration vers les tissus périphériques), jouant ainsi un rôle central dans l'atteinte microvasculaire du sepsis⁸².

Chez la souris, 6 TLRs sont exprimés au niveau du cœur : TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9⁸⁴. La stimulation par les ligands prototypiques de TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 active la voie NF- κ B et conduit à une dysfonction contractile des cardiomyocytes^{84,85}.

À l'heure actuelle, les deux TLRs les plus abondamment étudiés dans la recherche biomédicale sur les pathologies cardiovasculaires sont TLR2 et TLR4^{86,85,87}. En effet, il a été démontré que TLR4 est exprimé dans le cœur, son expression par les cardiomyocytes augmentant chez la souris et le rat après un infarctus⁸⁶, ainsi que par les monocytes/macrophages⁸⁸, et les cellules endothéliales⁸⁹. Il a été démontré que des molécules cardiaques endogènes sont capables d'activer TLR4 via la voie NF- κ B. Ces ligands cardiaques sont des composants de la MEC relargués suite à des dommages myocardiques, comme des dérivés de la fibronectine⁹⁰ ou de l'acide hyaluronique (hyaluronan)⁹¹ ou encore de l'héparane sulfate⁹².

L'expression de TLR4 est également augmentée au niveau du cœur chez l'homme après un IDM^{86,93,94}. De plus, l'inhibition de TLR4 au moyen d'antagonistes pharmacologiques réduit l'hypertrophie cardiaque⁹⁵. Dans un modèle murin de ligature coronaire permanente, la délétion du gène TLR4 réduit la progression du remodelage VG et préserve la fonction systolique sans affecter la taille de l'infarctus, le tout s'accompagnant d'une fibrose réduite et d'une diminution de l'expression des MMPs -9 et -2⁹⁶. D'autres modèles animaux d'ischémie/reperfusion ont également révélé que la délétion génétique de TLR4 réduit la taille de l'infarctus et réduit l'inflammation⁹⁷. Des données similaires ont été observées pour TLR2^{98,99}.

L'activation de ces récepteurs conduit à la production de plusieurs médiateurs importants :

TNF- α exerce ses effets par l'intermédiaire de ses récepteurs (TNFR) exprimés par presque toutes les cellules nucléées dont les cardiomyocytes¹⁰⁰. TNF- α est synthétisé par les cardiomyocytes et les cellules immunitaires et est capable d'induire localement l'apoptose des cardiomyocytes, contribuant ainsi à la dysfonction myocardique^{201,102} (Figure 11 **page 25**).

Dans un modèle de ligature permanente chez des souris KO pour TNF- α , le risque de rupture cardiaque était réduit et la fonction VG⁷⁰. D'un autre côté, une accélération de l'apoptose était observé chez des souris KO pour TNF- α ¹⁰³.

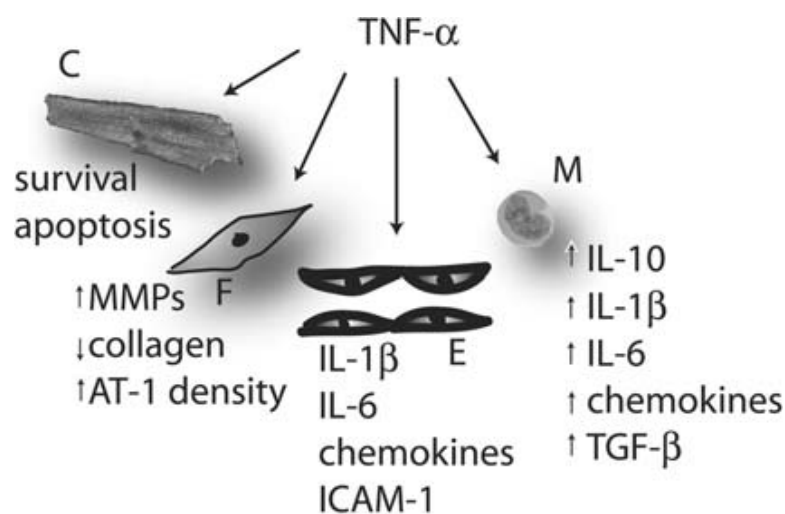


Figure 11 : Effets de TNF- α au cours de l'IDM

TNF- α est rapidement libéré après un infarctus du myocarde et peut moduler les caractéristiques phénotypiques ainsi que l'expression génique de plusieurs types cellulaires. D'après NIKOLAOS G. FRANGOIANNIS et al., 2006¹⁰²

La synthèse d'IL-6 est induite rapidement dans les cellules mononuclées et dans les cardiomyocytes des zones ischémiques^{104,105,106}. Les membres de la famille d'IL-6 ont des effets sur les myocytes cardiaque en promouvant l'hypertrophie cardiaque, mais aussi en les protégeant de l'apoptose¹⁰⁷. De même, l'IL-6 joue un rôle important dans la réparation cardiaque. L'inhibition de l'IL-6 par des anticorps diminue l'inflammation, atténue le remodelage cardiaque et améliore la survie après un infarctus chez la souris^{108,225,109} (Figure 12 **page 26**).

IL-10 : La réponse inflammatoire décrite précédemment est un phénomène nécessaire pour éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires de la zone myocardique infarctée. Cependant, cette inflammation est une phase aigüe transitoire qui se termine par l'arrêt de l'infiltration des cellules inflammatoires. Il semble que l'IL-10, joue un rôle important dans la résolution de l'inflammation¹⁰² : la production d'IL-10 induite durant la reperfusion diminue la production d'IL-6 par les macrophages et les myocytes dans la zone infarctée et réduit la production de métalloprotéinases favorisant ainsi la préservation de la matrice extracellulaire¹¹⁰.

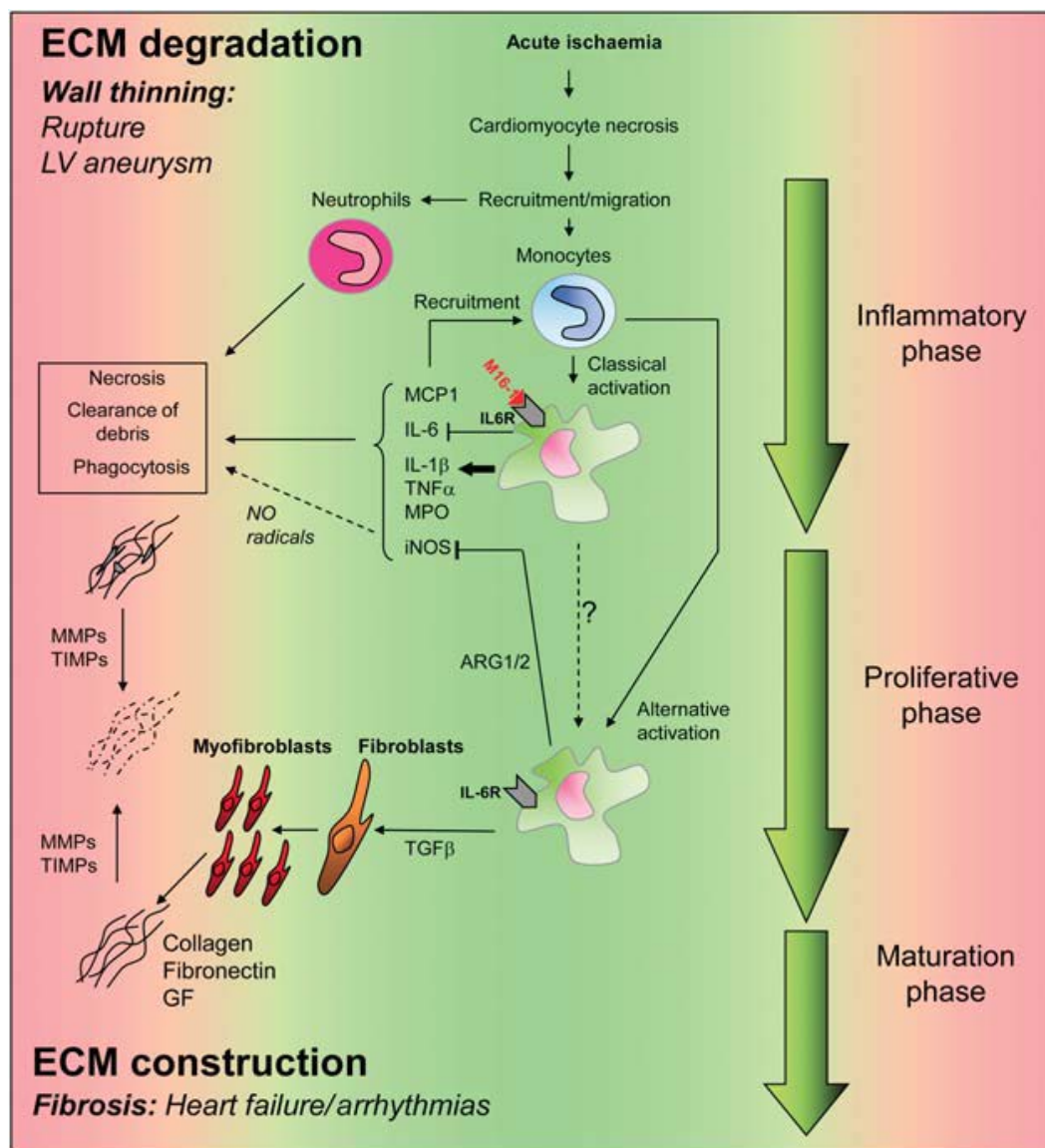


Figure 12 : Implication de l'IL-6 au cours du remodelage cardiaque post-infarctus

D'après : Möllmann, H et al 2010¹⁰⁹

DÉFAILLANCE VASCULAIRE ET DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

La défaillance vasculaire au cours du sepsis a été décrite dès 1960 par Gilbert, qui signalait la survenue d'une hypotension artérielle, d'une augmentation ou d'une diminution du débit cardiaque et d'une diminution des résistances vasculaires systémiques¹¹¹.

Cette défaillance vasculaire occupe une place centrale dans la physiopathologie du choc septique. Elle se traduit par une dysfonction endothéliale (lésions endothéliales, troubles de la microcirculation et hyperperméabilité), une vasoplégie avec des anomalies de contractilité du muscle lisse vasculaire.

De nombreuses études animales expérimentales ont rapporté des anomalies microcirculatoires au cours du sepsis^{112,113}. Ces altérations sont principalement caractérisées par une diminution de la densité des capillaires perfusés, une augmentation de l'hétérogénéité de la perfusion capillaire, une augmentation du nombre de ces capillaires sans flux ou avec un flux intermittent.

Au niveau vasculaire, l'activation des récepteurs TLRs induit une augmentation de l'expression de NF- κ B et sa translocation dans le noyau : il en résulte une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires, un stress oxydant et l'expression de plusieurs gènes inductibles. Ces éléments vont agir directement ou indirectement sur la paroi vasculaire et vont conduire à une défaillance vasculaire. Celle-ci se caractérise par une diminution du tonus vasoconstricteur et une hypo-réactivité vasculaire, avec une moindre sensibilité aux agents vasopresseurs. Il en résulte une vasodilatation et une hypotension artérielle réfractaire pouvant conduire au décès.

Dans le milieu des années 80, il commençait à apparaître que les inhibiteurs des NOS étaient capables pour une large part de rétablir cette réponse contractile aux agents vasoconstricteurs. Ces effets étaient maintenus dans des modèles de vaisseaux *ex vivo*, même en l'absence d'endothélium, suggérant que l'inflammation et le sepsis conduisait à l'expression d'une NOS, la NOS inductible (iNOS), au niveau du muscle lisse de la paroi vasculaire. La production excessive de NO par la iNOS conduit à l'altération de la réponse contractile. Au cours de la dysfonction vasculaire il y a une atteinte de la réponse vasculaire aux métabolites vasoconstricteurs¹¹⁴ (Figure 13 **page 28**).

Physiologiquement, l'endothélium est un véritable organe à part entière, qui joue un rôle majeur dans les fonctions de contrôle du tonus vasomoteur, le trafic des cellules et des nutriments ou le maintien de la fluidité du sang^{116,117}.

L'atteinte du système endothélial est donc un élément clé de la physiopathologie du choc septique. En effet, l'endothélium, stratégiquement situé entre les tissus et le sang circulant, est à la fois cible et acteur des mécanismes aboutissant aux dysfonctions vasculaires observées. Ces dysfonctions peuvent être décomposées en dysfonction microvasculaire, hypo-réactivité vasculaire aux stimuli vasoconstricteurs et dysfonction endothéliale¹¹⁸.

Tout d'abord, la perfusion microvasculaire, qui a comme objectif d'équilibrer l'apport tissulaire de l'oxygène et des nutriments aux besoins tissulaires, est fortement compromise lors du sepsis¹¹⁹. Plusieurs mécanismes y participent : l'écoulement perturbé du sang par diminution de la déformabilité des globules rouges¹²⁰, l'augmentation de l'agrégabilité des polynucléaires neutrophiles par augmentation de l'expression des molécules d'adhésion^{121,122} (Figure 14 **page 29**), ou la formation de microthrombi par stimulation de la cascade de la coagulation^{123,124}. A cela s'ajoute une production très importante de NO par iNOS, cause majeure d'hypotension lors du choc septique¹²⁵ et une dysfonction des mécanismes d'autorégulation vasculaire, responsable d'une hétérogénéité de la perfusion de la microcirculation¹²⁶. Un shunt de la microcirculation est également décrit, le transport de l'oxygène étant redirigé directement du compartiment artériel au compartiment veineux¹²⁷.

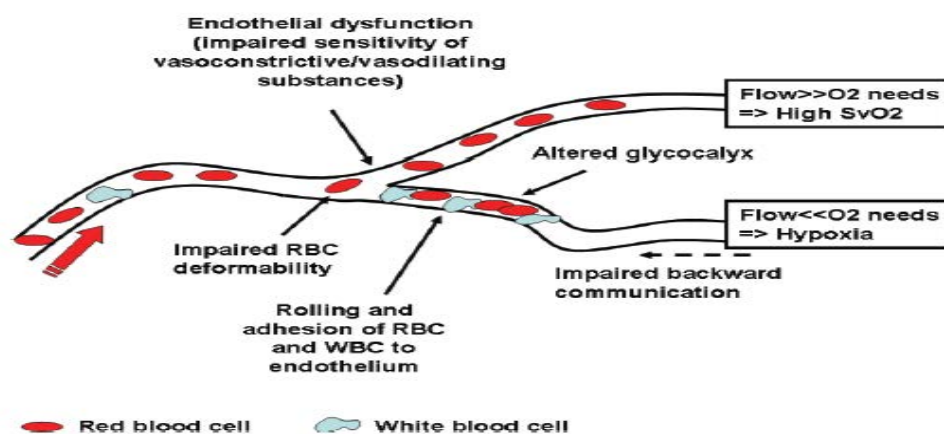


Figure 14 : Mécanismes participant à l'altération de la perfusion microvasculaire au cours du sepsis

D'après : De Backer D et al 2011¹²¹

L'ensemble de ces mécanismes maintient ainsi les tissus dans un état d'hypoxie. En réponse à la diminution d'apport de l'oxygène, les fonctions mitochondriales semblent se réduire afin de diminuer la consommation cellulaire en oxygène, ce qui pourrait contribuer aux dysfonctions d'organes des patients septiques.^{128,129}

Des dysfonctions endothéliales sont présentes lors des épisodes septiques résultant de lésions directes des cellules endothéliales. Tout d'abord, en réponse au LPS bactérien ou à certaines cytokines, les cellules endothéliales s'activent et expriment des molécules d'adhésion permettant l'ancrage des PNN à leur surface puis leur diapédèse dans les tissus sous-jacents.

Cette accumulation bénéfique pour l'élimination des agents infectieux peut avoir des effets tissulaires délétères *via* la production de protéases et de radicaux libres de l'oxygène¹²⁵. De tels radicaux peuvent être produits par les cellules endothéliales elles-mêmes après exposition à des cytokines comme l'IL-1 β ou l'IFN- γ , ainsi que des dérivés actifs du NO (peroxynitrite)¹³⁰. Les molécules oxydantes produites, en modifiant la structure des cellules endothéliales, altèrent l'intégrité de la barrière endothéliale, favorisant ainsi l'augmentation de la perméabilité endothéliale¹³⁰, déjà augmentée par le processus inflammatoire¹³¹.

C'est en 1980 que Furchgott, Ignarro, Murad et Zawadski ont mis en évidence le rôle crucial de l'endothélium, dans la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à l'acétylcholine¹³². Le contrôle de cette relaxation s'exerce par la sécrétion de différentes substances dont la synthèse dépend d'enzymes dont l'activité est régulée par le calcium cytosolique.

Sur le plan fonctionnel, la dysfonction endothéliale se traduit par une altération de la relaxation des vaisseaux par diminution de la sensibilité des récepteurs endothéliaux à l'acétylcholine, et une baisse de la réponse vasodilatatrice aux forces de cisaillement.

Puisque la reperfusion est associée à une augmentation des dommages infligés aux myocytes ischémiques¹³³, l'effet de la reperfusion sur les cellules endothéliales et le rôle que ces dernières jouent dans les lésions de reperfusion ont été le sujet de plusieurs études. En effet, suite à la reperfusion, il y a une production importante de radicaux libres par l'endothélium et ceci coïncide avec une dysfonction endothéliale; soit la perte de vasorelaxation ou l'insensibilité de l'endothélium à plusieurs vasodilatateurs. La dysfonction endothéliale se produit très rapidement après le rétablissement du flux sanguin¹³⁴.

D'autre part, l'ischémie conduit à une dysfonction endothéliale accompagnée d'une augmentation de la perméabilité et de l'expression de molécules d'adhésion recrutant des leucocytes, ce qui provoque une réaction inflammatoire aiguë faisant appel à la fois aux mécanismes de l'immunité innée et adaptative.

Les cellules endothéliales sont responsables de la régulation du tonus vasculaire et donc du flux sanguin. Une dysfonction de ces cellules peut mener à des vasospasmes pouvant à leur tour causer des phénomènes de non-reperfusion. De plus, une dysfonction endothéliale peut aussi conduire à une accumulation de neutrophiles.

Ces neutrophiles vont à leur tour provoquer une vasoconstriction encore plus importante en relâchant certains vasoconstricteurs tels que le thromboxane A₂ (TxA₂)¹³⁵. De plus, les neutrophiles vont contribuer à la réduction de formation de NO (vasodilatateur) par les cellules endothéliales favorisant la contraction¹³⁶. Le degré de vasoconstriction suit le nombre de neutrophiles¹³⁷. Ceci va alors occasionner un bouchon leucocytaire et les cellules en aval du bouchon seront privées d'oxygène malgré le rétablissement de l'occlusion. Une fois que les neutrophiles interagissent avec les cellules endothéliales, ceux-ci vont produire encore plus de radicaux libres¹³⁸. L'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire est accompagnée d'une diminution progressive de la fonction endothéliale¹³⁵ et ce sont tous ces éléments qui vont mener ultimement à la nécrose myocardique.

Plusieurs travaux expérimentaux et des observations cliniques ont démontré une dysfonction endothéliale des artères de résistance et/ou de conductance périphériques suite à un infarctus du myocarde^{139,140}. D'autre part, l'ischémie cardiaque provoque non seulement un dysfonctionnement cardiaque, mais également une atteinte de la relaxation des artères coronaires et une diminution de l'activité de eNOS/NO¹⁴¹.

On le voit donc, quel que soit le phénomène – infectieux ou ischémique – qui déclenche la cascade d'évènements de la réponse immune, un contrôle précis et balancé de l'inflammation est fondamental pour en permettre la résolution. Or, dans certaines situations, la réponse inflammatoire devient dérégulée et excessive, conduisant ainsi à une évolution défavorable : choc septique ou remodelage ventriculaire excessif dans le cas de l'infarctus.

Une des boucles d'amplification de la réponse inflammatoire fait intervenir un immuno-récepteur, le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM-1), dont nous allons décrire brièvement le rôle.

TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1)

Les immuno-récepteurs stimulateurs ont un rôle central dans la reconnaissance des antigènes étrangers et des pathogènes par le système immunitaire¹⁴². Des exemples typiques de ces immuno-récepteurs sont les B cell receptor (BCR) et T cell receptor (TCR), structures utilisées par les cellules B et T pour discriminer le soi du non-soi. Ces immuno-récepteurs sont composés de sites de liaison à un/des ligand(s) et sont associés à des protéines adaptatrices transmembranaires. Le domaine cytoplasmique des protéines adaptatrices contient un motif de type immuno-receptor tyrosine-based activation (ITAM) portant la séquence consensus YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I (x représentant un acide aminé [aa]). Parmi ces protéines adaptatrices, l'on retrouve les protéines CD3 ζ , FcR γ et DAP12 (DNA activating protein 12), également appelée Karap¹⁴². Plusieurs récepteurs activateurs de type immunoglobuline (Ig) ont été caractérisés : paired Ig receptors¹⁴³, NKp44¹⁴⁴ et la famille SHPS-1¹⁴⁵. Récemment, une nouvelle famille de récepteurs exprimés sur les cellules myéloïdes a été décrite : la famille des Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM)^{146,147}. Les isoformes des TREMs partagent peu d'homologie de séquence entre eux ou avec d'autres membres de la superfamille des Ig et sont remarquables par l'unicité de leur domaine Ig-like. Cinq gènes codant pour TREM ont été identifiés, dont quatre générant une glycoprotéine transmembranaire de type I fonctionnelle¹⁴⁶. Les gènes codant pour TREM sont clustérisés chez l'homme sur le chromosome 6 (chromosome 17 chez la souris). Tous les récepteurs de type TREM s'associent à l'adaptateur DAP12^{146,148}. Au sein de la famille TREM, TREM-1 a été identifié, tant chez l'homme que chez la souris, à la surface des neutrophiles et des monocytes matures. Son expression par ces cellules effectrices est majorée dans les fluides biologiques et les tissus infectés par des germes à Gram positif, négatif ou bien des levures^{149,150}. En revanche, l'expression de TREM-1 ne semble pas majorée au cours de certaines pathologies inflammatoires non infectieuses telles que le psoriasis, la rectocolite ulcéronécrosante, ou les vascularites médiées par les complexes immuns¹⁴⁹. Chez la souris, l'engagement de TREM-1 à l'aide d'un anticorps monoclonal agoniste stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines^{145,151} telles que IL-8, MCP-1 & 3, et MIP-1 α , et entraîne une dégranulation rapide des neutrophiles ainsi qu'un burst oxydatif¹⁵².

L'activation de TREM-1 en présence de ligands pour TLR2 ou TLR4 amplifie la production de cytokines proinflammatoires : TNF- α , IL-1 β , GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), et inhibe celle de l'IL-10¹⁵¹. Par ailleurs, l'activation de ces TLRs elle-même majore l'expression de TREM-1¹⁴⁷. Aussi, TREM-1 et TLRs semblent-ils coopérer dans la genèse de la réponse inflammatoire.

Le rôle de TREM-1 en tant qu'amplificateur de la réponse inflammatoire a été confirmé dans des modèles de choc septique chez la souris : le blocage de la signalisation via TREM-1 protégeait en partie les animaux du décès^{147,153}. Aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, des peptides synthétiques inhibiteurs mimant une courte portion de TREM-1 très conservée au sein des espèces atténuent la production de cytokines par les monocytes humains et protègent les animaux septiques du décès¹⁵⁴. Ces peptides sont d'ailleurs efficaces, tant en prévenant qu'en bloquant les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires¹⁵³.

TREM-1 : STRUCTURE ET FONCTION

Chez l'homme, TREM-1 (hTREM-1) consiste en une région extracellulaire de 194 acides aminés, une région transmembranaire de 29 acides aminés et une courte portion intracytoplasmique de 5 acides aminés. Le domaine extracellulaire de type Ig contient le motif DxGxYxC qui correspond à un domaine Ig de type 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 Lys qui s'associe à un résidu Asp appartenant à DAP12 : c'est ainsi qu'est formé le partenariat entre TREM-1 et sa protéine adaptatrice^{147,155}. L'activation de TREM-1 induit une signalisation qui implique ZAP70 (ζ -chain-Associated Protein 70) et SYK (Spleen tYrosine Kinase), puis un recrutement et une phosphorylation des résidus tyrosine d'autres molécules adaptatrices telles que GRB2 (Growth factor Receptor Binding protein 2), une activation de PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), PLC- γ (PhosphoLipase C- γ), ERK-1, -2 (Extracellular-signal-Regulated Kinase), p38 MAPK (p38 Mitogen-Associated Protein Kinase), Akt serine/threonine kinase, STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5)^{156,157} et de l'assemblage du complexe CARD9-MALT1-BCL10^{158,159} (Figure 15 **page 34**).

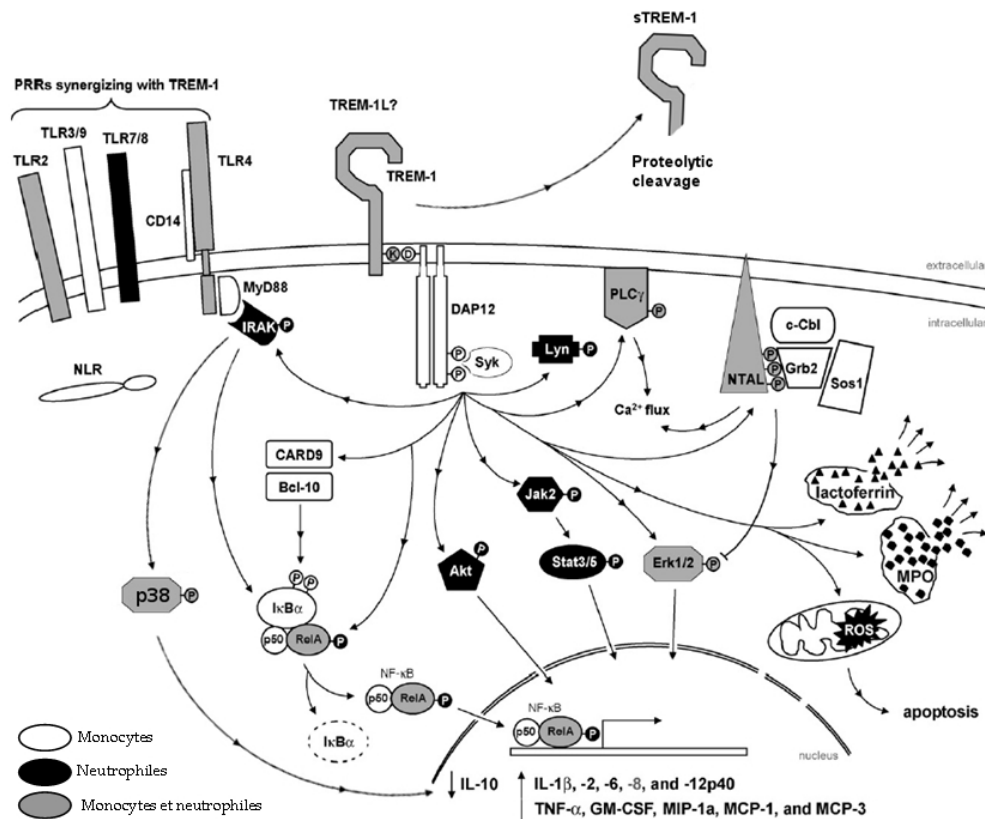


Figure 15 : Voies de signalisation de TREM-1 et DAP12 dans les cellules myéloïdes

Les lignes en pointillé désignent la dégradation protéique. Adapté de Tessarz et Cerwenka., 2008

La mise en jeu de ces voies de signalisation 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 finalement en une production de métalloprotéases¹⁶⁰, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines^{151,153,161,162} dont MCP-1, MIP1- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , et d'une dégranulation des neutrophiles^{152,158}. L'engagement des récepteurs de type NOD (NLRs) et de certains TLRs induit une up-régulation de TREM-1 et son exposition à la membrane^{147,163,164}. La régulation de TREM-1 par ces récepteurs est indépendante de MyD88, mais sous le contrôle de TRIF¹⁶⁵, et implique les facteurs transcriptionnels NF- κ B (p65), PU.1 et AP1¹⁶⁶. La co-activation TLR/NOD-TREM-1 résulte en une production de cytokines bien supérieure à la somme des réponses individuelles médiées par l'engagement de ces récepteurs pris isolément¹⁴⁹. Il est à souligner que l'engagement isolé de TREM-1 ne conduit pas au développement d'une réponse inflammatoire soutenue.

Le silencing de TREM-1 au niveau de cellules myéloïdes stimulées par du LPS est responsable d'une diminution d'expression de plusieurs médiateurs clés de la cascade de signalisation de TLR-4¹⁶². En fait, la fonction de TREM-1 est de moduler plutôt que d'initier/activer la réponse inflammatoire et ces données suggèrent une coopération entre TREM-1 et ces autres pattern recognition receptors (PRRs).

Aux côtés d'une forme membranaire, un fragment soluble de TREM-1 est libéré par clivage du domaine extracellulaire¹⁶⁷. 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 septiques¹⁵², et s'oppose ainsi à l'activation de TREM-1^{149,168}. Afin de contrecarrer le développement d'une réponse inflammatoire excessive, d'autres mécanismes existent qui impliquent d'autres membres de la famille TREM. Par exemple, Hamerman et al. ont montré que d'autres récepteurs couplés à DAP12 régulaient négativement la signalisation via les TLRs¹⁶⁹. L'un de ces récepteurs pourrait être TREM-2¹⁷⁰. Ces données suggèrent ainsi que les cellules immunes sont capables d'intégrer la somme de différents signaux par des récepteurs tels que TREM-1 et TREM-2, afin d'initier une réponse inflammatoire équilibrée.

TREM-1 apparaît également impliqué dans le dialogue plaquette/neutrophile. En effet, un ligand pour TREM-1 est exprimé de façon constitutive sur les plaquettes et les mégacaryocytes¹⁶⁸. Si ce ligand plaquettaire de TREM-1 n'est pas responsable de la formation des complexes plaquettes/neutrophiles, l'interaction avec TREM-1 exprimé sur le neutrophile conduit à l'activation de ce dernier.

Considérant le rôle de TREM-1 dans l'amplification de la réponse inflammatoire, il est tentant de vouloir en moduler l'activation au cours de pathologies impliquant une inflammation excessive.

COMMENT MODULER L'ACTIVATION DE TREM-1 ?

Même si les analyses cristallographiques^{171,172} prédisent les sites de reconnaissance d'un ligand pour TREM-1 (boucles de type CDR de manière similaire à TCR, CD8 ou CTLA-4), celui-ci demeure toujours inconnu.

Nous avons synthétisé plusieurs peptides dérivés de TREM-1 et remplissant les conditions suivantes :

- Homologie importante entre les séquences humaines et murines et nulle avec TREM-2 (séquence de TREM-1 dans GenBank/EMBL/DDBJ accession no XM217336, AF287008 et AF241219) ;

- Peptides comprenant les CDRs de TREM-1.

Différents peptides, dont LP17, interagissaient directement avec le ligand de TREM-1¹⁵⁴ et étaient capables de bloquer ainsi la fixation de ce ligand sur TREM-1 et donc l'activation de ce dernier.

Ces données nous ont conduits à chercher si le ligand de TREM-1 pouvait être exprimé à la surface des cellules myéloïdes. Cinq heures après la réalisation d'une péritonite chez la souris, nous avons ainsi retrouvé une forte expression du ligand de TREM-1 à la surface des neutrophiles péritonéaux, alors que les neutrophiles isolés du péritoine d'animaux témoins (chirurgie sans perforation caecale) n'en exprimaient pas. Ces données suggèrent une expression sélective du ligand de TREM-1 au cours de l'infection. Par ailleurs, la cinétique d'expression du ligand de TREM-1 était différée à la surface des neutrophiles circulants reflétant soit une recirculation des neutrophiles à partir du péritoine, soit une bactériémie retardée. Un autre mécanisme par lequel des peptides dérivés de TREM-1 pourraient exercer leur action a été suggéré par Hammerman et al¹⁶⁹. Ces auteurs ont en effet montré que les macrophages déficients pour DAP12 produisaient de fortes concentrations de cytokines en réponse à différents stimuli microbiens. Par ailleurs, les souris KO pour DAP12 étaient rendues très susceptibles à l'endotoxine, tout en étant résistantes à une infection par *Listeria monocytogenes*. Ces données sont en faveur de l'existence de récepteurs associés à DAP12 qui régulent négativement la signalisation via certains TLRs. L'un de ces récepteurs pourrait être spécifique de sTREM-1 (et donc reconnaître également certains peptides dérivés) puisque la plupart des récepteurs couplés à DAP12 possèdent également un récepteur inhibiteur relié¹⁶⁹.

EFFETS DE LA MODULATION DE TREM-1 AU COURS DU SEPSIS

L'implication de TREM-1 dans l'amplification de la réponse immune de l'hôte en réponse à une agression microbienne a été décrite pour la première fois par Bouchon et al^{147,149} : les tissus infectés étaient infiltrés par des neutrophiles et des macrophages exprimant fortement TREM-1. *In vitro*, les neutrophiles et les monocytes stimulés par du LPS et un α TREM-1 (anticorps monoclonal dirigé contre TREM-1 et servant d'agoniste spécifique), étaient suractivés en comparaison avec l'activation médiée par le LPS seul.

Finalement, le blocage de TREM-1 par une protéine chimérique composé d'un fragment Fc et du domaine extracellulaire de TREM-1 (mTREM-1/IgG1) protégeait les souris septiques du décès¹⁴⁹.

L'administration de LP17 — un antagoniste peptidique de TREM-1 — à des souris septiques était associée à une diminution des concentrations plasmatiques de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Les animaux traités par LP17 étaient également protégés de la dysfonction d'organe¹⁵⁴, de la défaillance hémodynamique¹⁵⁴ et du décès. Par ailleurs, des données non publiées issues du laboratoire confirment que la modulation de TREM-1 s'associe à une amélioration significative de la fonction cardiaque au cours du sepsis polymicrobien.

De manière intéressante, alors que le silencing partiel de TREM-1 *in vivo* confère une protection similaire à celle observée par un traitement par LP17, un silencing plus complet est responsable d'une diminution de la clairance bactérienne et d'une diminution de la survie au cours du sepsis polymicrobien chez la souris¹⁷³. En revanche, ce silencing complet protégeait du décès les souris endotoxiques : cela indique donc un rôle bénéfique de l'activation — à un certain degré — de TREM-1 dans la génération d'une réponse inflammatoire suffisante et nécessaire à l'éradication bactérienne.

Chez l'homme, les infections respiratoires basses sont l'étiologie principale du sepsis. Les concentrations de sTREM-1, mais également de TNF- α et d'IL-1 β , sont élevées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) des patients souffrant de pneumonie communautaire ou acquise sous ventilation mécanique ; le dosage de sTREM-1 pouvant même être intéressant en tant que biomarqueur diagnostique¹⁷⁴. Par ailleurs, dans un modèle de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez le rat, un traitement par LP17 était associé à une amélioration hémodynamique, une diminution de l'inflammation locale et systémique et à une diminution de l'activation de la coagulation. In fine, LP17 améliorait la survie¹⁵⁴.

En Asie du Sud-Est et en Australie, *Burkholderia pseudomallei* (un bacille à Gram négatif) est une cause importante de sepsis communautaire.

Plus de la moitié de ces mélioïdoses se présentent sous la forme de pneumonie fréquemment associée à une dissémination bactérienne à distance. Wiersinga et al¹⁷⁵ ont montré qu'au cours de la mélioïdose, l'expression de TREM-1 était up-régulée à la surface des monocytes et des neutrophiles. Une élévation des concentrations plasmatiques et alvéolaires de sTREM-1 était également présente. Les concentrations de sTREM-1 étaient plus élevées chez les patients non survivants que chez les survivants, suggérant ainsi un rôle de sTREM-1 en tant qu'outil pronostique au cours de cette infection. Des résultats similaires étaient obtenus dans un modèle murin de mélioïdose induite par l'instillation intra-trachéale de *B. pseudomallei*. Dans ce modèle, LP17 réduisait la bactériémie et améliorait la survie¹⁷⁵.

TREM-1 apparaît jouer un rôle de senseur pour différents signaux de danger extracellulaires tels que théorisés par Matzinger¹⁷⁶. De très nombreuses études expérimentales ont maintenant démontré l'implication de TREM-1 au cours du sepsis, mais également d'autres pathologies inflammatoires aiguës, chroniques, d'étiologie infectieuse ou non¹⁷⁷. Dans toutes ces études, la modulation de TREM-1 s'avérait bénéfique : l'avantage d'une telle stratégie, par rapport à d'autres approches, est que la modulation de TREM-1 ne s'accompagne jamais d'une inhibition complète de la réponse inflammatoire, cruciale pour la clairance microbienne, le contrôle de la progression tumorale. Ainsi, des peptides tels que LP17 pourraient représenter une nouvelle classe d'agents anti-inflammatoires capables de moduler plutôt que d'inhiber l'inflammation au cours de nombreuses pathologies.

OBJECTIFS

Le principal objectif de ce travail de thèse consiste à mieux comprendre le rôle de TREM-1 dans la genèse de la dysfonction endothéliale et cardiaque au cours du sepsis et de l'infarctus du myocarde expérimental.

La première étape de ce travail consistera à démontrer que TREM-1 est exprimé et impliqué dans la dysfonction endothéliale et cardiaque au cours du sepsis expérimental.

Dans une seconde partie, nous chercherons à démontrer l'implication de TREM-1 dans la réponse inflammatoire au cours de l'IDM et l'effet de son inhibition par un court peptide synthétique, LR12.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux ont été traités en accord avec la réglementation française et européenne concernant l'expérimentation animale. Des rats mâles Wistar (300-320 g) et des souris mâles Balb/c de 4 à 6 semaines (Dépré, Saint Doulchard, France) ont été hébergés dans des conditions contrôlées (pièces thermorégulées à 22°C et éclairées 12 heures sur 24) et de stress minimal. Les animaux ont eu accès libre à l'eau et à la nourriture. Les expérimentations étaient réalisées après une semaine de stabulation au minimum.

Modèle de sepsis murin par Ligature et Perforation Caecale (CLP)

Les animaux (rats, souris) étaient anesthésiés à l'isoflurane (induction de l'anesthésie en chambre d'induction, puis continue sous masque, Isoflurane). Un modèle classique de péritonite par ligature et perforation caecale (CLP)¹⁷⁸ était réalisé et une restauration volémique (10ml/kg, s.c.) effectuée.

Les animaux (rats et souris) étaient ensuite randomisés en deux groupes (n=6) :

- Groupe LR12 : administration i.p. de 5mg/kg de LR12 1 heure après la chirurgie
- Groupe LR12-scr : administration i.p. de 5mg/kg de peptide contrôle ('scramble') correspondant à un peptide composé des 12 aa de LR12 dans un ordre aléatoire, 1 heure après la chirurgie
- Un groupe contrôle était également constitué (groupe 'sham') comprenant des animaux opérés mais sans perforation et ligature caecale.

Les souris étaient sacrifiées 18 heures après la réalisation de la chirurgie par injection létale i.p. de penthotal afin de prélever les vaisseaux (aorte et artère mésentérique), les poumons et le foie.

Chez les rats l'artère carotide interne gauche était cathétérisée sous anesthésie par isoflurane 18 heures après la péritonite afin de mesurer les paramètres vitaux tels que la pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque ainsi que d'étudier la fonction myocardique grâce à une sonde de pression/volume reliée au système d'acquisition des données IOX (EMKA Technologies, Paris, France). Après l'instrumentation, une période de repos de 30 min a été respectée afin que les paramètres hémodynamiques des rats se stabilisent.

Les rats étaient ensuite sacrifiés sous anesthésie (chambre d'induction à l'isofluorane et injection létale de penthotal i.p.) afin de prélever sang et vaisseaux (aorte thoracique et artère mésentérique). La lactatémie artérielle était déterminée à l'aide d'un analyseur automatique des gaz du sang (ABL 700 ; Radiometer, Copenhagen, Danemark).

Réactivité vasculaire

Les vaisseaux aortiques et mésentériques des animaux opérés (sham et CLP) étaient prélevés à la 18^{ième} heure. Des vaisseaux issus d'animaux sains étaient également prélevés et incubés ou non en présence de LPS (*E.coli*, O111 :B4, Sigma) 10µg/mL, de LR12 (20ng/mL), de LR12-scr (20ng/mL) ou de 5µg/mL d'un anticorps agoniste anti-TREM-1 (RnD Systems) pendant 4 heures. Les mêmes conditions étaient également appliquées sur des vaisseaux désendothélialisés. Les anneaux aortiques et mésentériques étaient montés dans des chambres de myographie dont le principe est le suivant : deux tiges métalliques sont insérées dans la lumière du vaisseau. L'une d'elles est reliée à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. L'autre tige métallique est reliée à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) et à un système d'acquisition et de traitement des données. Chaque segment est monté dans une cuve contenant 10ml d'une solution physiologique (PSS) de composition suivante : 119mM NaCl, 14,9mM NaHCO₃, 4,7mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1,2mM MgSO₄, 2,5mM CaCl₂, 1,18 mM KH₂PO₄, 5,5mM glucose et de pH 7.4. La solution est bullée avec un mélange de 95% O₂ / 5% CO₂ et rincée toutes les 15 minutes. Une pré-tension de 4.9 et de 9.8mN est exercée respectivement sur les segments vasculaires. Après une période de stabilisation de 20min, la concentration maximale des vaisseaux est mesurée en deux étapes : dépolarisation dans un bain de KCl (100mM), puis KCl (100mM) + U 46619 (10⁻⁴) (Cayman Chemical Company) pour évaluer la contraction maximale. La courbe « concentration-réponse » à l'agoniste vasoconstricteur (phényléphrine) (1nM à 100µM) est déterminée.

La courbe « concentration-réponse » à l'agoniste vasodilatateur acétylcholine (1nM à 100µM) est étudiée suite à une précontraction à la phényléphrine (1µM) (80% de la contraction maximale).

Isolement des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et hépatiques

Les poumons et les foies de souris saines ou septiques (18h après CLP) étaient prélevés sous anesthésie (chambre d'induction à l'isoflurane puis injection létale de penthotal i.p) pour prélever le poumon et le foie. Les organes étaient lavés dans du DMEM-SVF 10% puis coupés en petits morceaux de 1-2mm de diamètre. Les morceaux étaient digérés par la collagénase type I (2mg/ml, GIBCO) à 37°C pendant 1 heure sous agitation. Les cellules digérées étaient filtrées grâce à des filtres de 70µm, puis centrifugées à 1500rpm pendant 15min. Les cellules récupérées étaient mises en culture dans des plaques coatées avec du collagène dans du DMEM/F12 (Gibco) supplémenté par SVF 20% et 100 µg/ml de facteurs de croissance (ECGS, BD Biosciences) en présence d'antibiotiques. Après 24 heures de culture, les cellules flottantes étaient éliminées et les plaques étaient lavées avec du PBS avant que le milieu de culture ne soit remplacé. Après 5 jours, une première sélection était réalisée (après trypsination des puits) par l'utilisation de billes magnétiques (CD146 microbeads, Miltenyi Biotech). Les cellules CD146⁺ ainsi sélectionnées sont remises en cultures dans les conditions préalables avant d'être soumises à une seconde sélection positive en moyenne 10 jours plus tard (à 80% de confluence). La pureté et la viabilité des cellules étaient respectivement de 80 et 90% à la fin de la période de culture. L'expression de VEGFR2 et de CD146 était vérifiée par cytométrie en flux.

Modèle d'infarctus du myocarde : ischémie-permanente (IP) chez la souris

Les animaux étaient anesthésiés avec la xylazine (60mg/kg, ip), puis placés sur une couverture chauffante pour pouvoir contrôler leur température (37°C), intubés et ventilés (ventilateur Harvard de type 845, Harvard apparatus, les Ulis, France) avec de l'oxygène pur (volume courant = 200µl/25g, fréquence respiratoire = 170cycles/min). Par la suite une thoracotomie latérale gauche était pratiquée au niveau du troisième espace intercostal et le péricarde était incisé. L'artère coronaire marginale gauche était visualisée grâce à l'utilisation d'une loupe binoculaire Stemi 2000 (ZEISS, Microsystèmes, France) et un fil non résorbable était passé sous l'artère coronaire, à environ 2 mm de l'oreillette gauche (Prolène 8/0). Une occlusion coronaire irréversible était effectuée selon la technique de Virag et Lust 2011¹⁷⁹. Cette occlusion était objectivée directement par le blanchiment du myocarde ischémique. La cage thoracique de l'animal était alors refermée à l'aide de Prolène 6/0 résorbable et les animaux retournaient dans leur cage où

ils étaient surveillés jusqu'à leur réveil complet. Les souris étaient randomisées pour recevoir une injection i.p. de LR12 ou de LR12-scr (5mg/kg, 5 jours). Une première série de souris était utilisée pour étudier la survie. La deuxième série était sacrifiée sous anesthésie suivie d'une dose létale de phénobarbital à différents temps (H6, H24, H72, H96, 7 jours, 5 semaines) (n=6/ groupe et par temps). A H24, le thorax était rouvert et 0,5 mL de bleu d'Evans (5%, Sigma, Saint-Quentin fallavier, France) était administré par une veine jugulaire. (Le passage de ce colorant dans la circulation générale de l'animal se traduit dans un premier temps par la coloration en bleu des poumons, des muqueuses et de la peau de l'animal. Au niveau du cœur, la zone irriguée par la coronaire ligaturée reste blanche et constitue l'aire à risque (AAR), le reste du cœur étant coloré en bleu). Le cœur était prélevé et les oreillettes incisées. Le ventricule gauche (VG) était pesé puis découpé en 3 tranches, basale, médiale et apicale. Les coupes étaient pesées puis photographiées une première fois à l'aide d'un appareil photo numérique (Powershot S50, Canon, Paris, France) ce qui permettait de déterminer l'AAR par analyse d'image. Les coupes étaient ensuite incubées dans une solution de TTC 1% (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) pendant 20 minutes à 37°C, puis dans une solution de formol (3,7%) pendant 24 heures. Le TTC colore les cellules encore vivantes en rouge brique. Finalement, les coupes étaient photographiées une seconde fois, ce qui permettait de déterminer la zone infarctée (AI).

Les surfaces des AAR et des AI étaient déterminées par planimétrie à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Scion 4.02, Scion corporation). Les valeurs de ces surfaces étaient ensuite pondérées en fonction des poids respectifs des coupes. Pour chaque cœur, on déterminait les 3 rapports suivants : AAR/VG, AI/VG et AI/AAR, qui sont exprimés en pourcentage et calculés comme suit :

$$\text{AAR/VG} = \frac{\sum \text{des poids des AAR} \times 100}{\text{Poids du VG}}$$

$$\text{AI/VG} = \frac{\sum \text{des poids des AI} \times 100}{\text{Poids du VG}}$$

$$\text{AI/AAR} = \frac{\sum \text{des poids des AI} \times 100}{\sum \text{des poids des AAR}}$$

Les zones infarctées et non-infarctées étaient ensuite séparées avant d'être soumises à différentes analyses.

A noter qu'une série d'animaux différente était nécessaire pour l'analyse de la composition leucocytaire du cœur, de la rate, de la moelle et du sang.

Modèles d'IDM chez le rat (ischémie permanente et ischémie/reperfusion)

Des infarctus étaient réalisés chez des rats adultes, secondairement randomisés pour recevoir LR12 ou LR12-scr selon le même schéma d'administration que précédemment. La fonction cardiaque était analysée par deux techniques différentes : une approche non invasive par tomoscintigraphie par émission de positons au 18F-FDG (PET-scan) à J0 et six semaines après l'IDM, et une méthode invasive par cathéter de conductance (sonde de Millar) après la réalisation du deuxième PET-scan. Cette étude comportait deux phases : une première phase d'ischémie permanente, et une seconde phase d'infarctus revascularisés, c'est-à-dire avec reperfusion.

Tous les rats étaient anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine (100mg/kg) puis ventilés mécaniquement après intubation oro-trachéale. Après réalisation d'une thoracotomie gauche, l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) était identifiée puis ligaturée avec du fil de suture chirurgicale non résorbable type prolène 6-0. L'efficacité de l'occlusion était confirmée visuellement par une perte de la coloration rouge du myocarde, remplacée par un aspect blanc de la zone ischémisée. Le thorax était alors refermé et la peau suturée. Les rats étaient replacés dans leurs cages, sous surveillance jusqu'à leur réveil complet. Le taux de mortalité péri-opératoire s'élevait à environ 20%.

Lors de la première phase, l'occlusion coronaire n'était pas levée, réalisant donc une ischémie permanente (groupe IP). Le peptide inhibiteur LR12 était administré par voie intrapéritonéale, après la randomisation qui avait lieu lors de la réalisation du premier PET-scan, soit 2 à 4 heures après le début de l'ischémie, puis toutes les 24h pendant 5 jours. Chaque injection correspondait à une dose de 5mg/kg de LR 12 dans le groupe traité ou LR12-scr dans le groupe témoin.

Lors de la deuxième phase, la même chirurgie était réalisée mais l'ischémie était levée après 60 minutes en relâchant la ligature de l'IVA. Une première dose de LR12 (5mg/kg) ou de LR12-scr était administrée 15 minutes avant la reperfusion, puis une deuxième lors de la reperfusion puis toutes les 24h pendant 5 jours.

Etude en tomoscintigraphie par émission de positons

Principes d'acquisition et traitement des images

La tomographie par émission de positons permet d'étudier in vivo le fonctionnement biochimique d'un organe, notamment le cœur. Les cellules normales, par exemple,

consomment du glucose, alors que les cellules infarctées n'en consomment pas, ce qui permet de repérer par cette technique d'éventuelles zones de nécrose myocardique. Le principe physique du PET-scan est basé sur la détection des rayonnements gamma issus de la désintégration des particules émises par des isotopes émetteurs de positons. La caméra TEP est constituée de plusieurs couronnes de blocs détecteurs permettant ainsi de recueillir le maximum de paires de photons gamma.

L'acquisition et le traitement des images ont été réalisés au Département de Médecine Nucléaire du CHU de Nancy (Nancyclotep). Après l'acquisition des données, une reconstruction tridimensionnelle avec réorientation manuelle du cœur est nécessaire pour permettre l'analyse des données. Ce changement d'axe permet l'étude en segmentation et la détermination automatique des contours de la paroi cardiaque. Un logiciel permet alors de calculer différents paramètres cardiaques, notamment les volumes télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS) du ventricule gauche, la fraction d'éjection (FE) et le pourcentage de myocarde infarcté.

Protocole expérimental

Deux études par PET-scan étaient réalisées chez tous les rats. Le premier PET-scan était effectué le jour même de la réalisation de l'IDM, en moyenne 2h après la fin de la chirurgie, tandis que le deuxième PET-scan se déroulait environ 6 semaines après. Le protocole décrit ci-dessous était respecté pour les deux examens.

La veille de l'examen, l'animal était mis à jeun pendant une nuit. Après anesthésie générale par inhalation d'un mélange isoflurane-oxygène (2%), et une mesure de la glycémie, une première prémédication par un dérivé de l'acide nicotinique était effectuée via une canule gastrique (Acipimox, Olbetam®, 25mg/Kg). L'acide nicotinique permet une meilleure captation cardiaque du glucose en diminuant le taux plasmatique d'acides gras libres, substrats énergétiques préférentiels du myocarde.

Une heure après, une deuxième dose d'acipimox était administrée (25mg/Kg) et un volume moyen de 0,3mL, contenant environ 74MBq de 18F-FDG (désoxyglucose au Fluor marqué 18F), était injecté par voie intraveineuse (veine péniennne). Une acquisition statique, sous anesthésie générale, d'une durée de 20 minutes était débutée 60 minutes après injection du traceur.

A la fin de l'examen, et dans le but de corriger le phénomène d'atténuation, une acquisition de transmission d'une durée de 6 minutes était réalisée à l'aide de deux sources de cobalt-57 incluses dans l'appareil du PET-scan. La reconstruction des images acquises était enfin effectuée à partir des images obtenues lors de l'acquisition statique d'émission et de l'acquisition de transmission.

Les images ont été reconstruites par une méthode itérative tridimensionnelle aboutissant à des voxels de taille 0,4x0,4x0,8mm et une résolution spatiale proche de 1mm. Le cycle cardiaque a été divisé en 16 intervalles, ce qui a permis d'obtenir une résolution temporelle de 11 à 15ms pour une fréquence cardiaque de 250 à 375min⁻¹.

La réorientation du ventricule gauche en coupes jointives grand-axe et petit-axe a été effectuée en utilisant un logiciel clinique standard (SIEMENS, Inveon Acquisition Workplace IAW). Les volumes télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS) du ventricule gauche ont été mesurés de manière automatique, à partir de coupes petit-axe jointives à l'aide d'un logiciel QGS (Quantitative Gated SPECT).

Etude par cathéter de conductance (Millar)

La méthode de la mesure des volumes ventriculaires gauches instantanés par cathéter de conductance a été initialement décrite par Baan¹⁸⁰, puis a été validée, tant chez l'homme que chez l'animal, y compris le rat. Dans l'expérience princeps, la pression et le volume étaient mesurés par deux cathéters indépendants, introduits ensemble dans le ventricule gauche. Les progrès technologiques rendent possible, grâce à des cathéters miniaturisés, la mesure instantanée continue des pressions et volumes intra-ventriculaires, permettant l'étude instantanée des courbes pressions-volumes cardiaques et le calcul de nombreux paramètres hémodynamiques de la performance cardiaque, in vivo. Les cathéters utilisés se composent d'un micro-manomètre de pression haute-fidélité central, cerné de part et d'autre par 2 paires d'électrodes de conductance, distales placées à l'apex du ventricule, et proximales, placées dans la région sous-valvulaire.

Le signal perçu est amplifié et digitalisé au moyen d'un convertisseur A/D MCPU-200 Aria® (Millar Pressure Conductance Unit model 200, Millar Instruments Inc, Houston, TX), et enregistré et analysé en continu par un logiciel d'acquisition de données IOX 2.2.0® (EMKA Technologies, France), permettant une analyse post hoc. Une trentaine de paramètres mesurés ou calculés à partir des courbes de pression et de volume ventriculaires, ainsi que les courbes pressions-volumes (P-V), sont traités et disponibles

en continu. La position optimale du cathéter, critique pour l'obtention de courbes P-V de qualité, est jugée sur l'aspect de ces mêmes courbes.

Données de base des courbes pression-volume

Le cathéter de conductance mesure toutes les millisecondes les paramètres de pressions et de volumes ventriculaires gauches. Ceci permet de construire en continu, pour chaque cycle cardiaque, une courbe pression-volume ventriculaire gauche. Les principaux paramètres mesurés sont les suivants : Pmax (Pression maximale intra ventriculaire gauche), PTSVG, PTDVG, VTDVG, VTSVG (Pressions et Volumes télésystolique et télédiastolique ventriculaires gauches), dP/dt max (augmentation maximale de pression durant la phase de contraction isovolumétrique), dP/dt min (diminution maximale de pression durant la phase de relaxation isovolumétrique), Tau (constante de relaxation, dérivée première mono exponentielle de la courbe de pression entre la pression systolique maximale et la pression proto diastolique suivante), FC (Fréquence Cardiaque), DC (Débit Cardiaque).

L'analyse des paramètres indiqués ci-dessus est importante pour étudier les fonctions systoliques et diastoliques ventriculaires gauches. Il a été néanmoins démontré en 1973 par Suga et Sagawa, que beaucoup de ces paramètres, tels que le débit cardiaque ou le dP/dt max, sont influencés par les conditions de charge du ventricule gauche¹⁸¹.

Données des courbes pression-volume pendant l'occlusion de la veine cave inférieure

L'occlusion de la veine cave inférieure (VCI) permet de modifier instantanément les conditions de précharge et de produire une série d'une vingtaine de courbes pressions-volumes ventriculaires gauches ayant un niveau de précharge différent. D'autres méthodes de modification des conditions de charge ont été proposées (méthodes pharmacologiques, méthodes mécaniques, modifications de la post-charge,...), mais l'occlusion de la VCI demeure la plus habituellement décrite, limitant au maximum la survenue de réflexes cardiovasculaires susceptibles de fausser la mesure¹⁸².

La localisation des points télésystoliques sur cet ensemble de courbes décrit une ligne, définie par un niveau d'inotropisme donné. Cette ligne se nomme la «relation pression-volume de fin de systole» ou ESPVR (end systolic pressure volume relationship). De nombreuses études montrent une linéarité satisfaisante de l'ESPVR pour un intervalle assez large de volumes, procurant une description simple, et réputée largement insensible

aux conditions de charge, du niveau d'inotropisme. Elle est caractérisée par une pente d'élastance (Ees) et un "volume intercept". La relation ESPVR est la base du modèle définissant la contraction myocardique comme une variation temporelle de l'élastance ("time-varying elastance" énoncée par Sagawa). L'élastance ventriculaire devient maximale en fin de systole. Le paramètre Ees correspond à la pente de la droite passant par les points télé-systoliques des courbes Pression-Volume. Ees est corrélé étroitement aux variations de contractilité myocardique induites par des agents inotropes¹⁸¹. De la même façon, le paramètre PRSW (preload recruitable stroke work), établi selon les mêmes méthodes, présente des avantages superposables à l'ESPVR ¹⁸³. Par ailleurs, l'analyse de la portion diastolique des courbes P-V permet une étude de la compliance et de la capacitance ventriculaire. La courbe reliant les points télédiastoliques des courbes pression-volume lors de l'occlusion correspond à la « relation pression-volume de fin de diastole » ou EDPVR (end diastolic pressure volume relationship) et permet une Evaluation globale de la fonction diastolique¹⁸⁴.

Protocole expérimental

Ce protocole suit les recommandations de la littérature publiées par Pacher et al au sujet de l'utilisation de la sonde de Millar chez l'animal¹⁸⁵. Une fois anesthésiés (isoflurane, Fi=3% puis Fi=1,5%), les animaux étaient trachéotomisés et ventilés mécaniquement. Une curarisation était réalisée par bromure de pancuronium (2mg/kg).

Une expansion volémique était instaurée pendant toute la durée de l'expérience par du sérum salé isotonique (10ml/kg/h) au pousse-seringue électrique. La température était mesurée et maintenue stable grâce à une lampe radiante et une table chauffante.

Une thoracotomie était réalisée pour permettre l'accès à la veine cave inférieure dans sa portion sus-diaphragmatique. Après dissection de la carotide droite sur environ 25mm de longueur, un cathéter de conductance Millar 2-Fr. (Mikro-Tip® Catheter Transducer, modèle SPR-838, longueur 12cm, Millar Instruments, Houston, Texas) était introduit et monté par voie rétrograde dans le ventricule gauche.

L'enregistrement en continu des principaux paramètres hémodynamiques myocardiques était réalisé par le logiciel IOX 2.4.2.8® (EMKA Technologies, France). Après une première période de stabilisation de dix minutes, une injection de sérum salé hypertonique (40µl de SSH30%) permettait la détermination du volume parallèle (Vp) afin d'estimer le volume ventriculaire gauche.

Après une deuxième période de repos de dix minutes, les paramètres de base étaient enregistrés lors d'une courte période d'apnée. L'occlusion intermittente de la veine cave inférieure permettait ensuite le tracé de courbes pression-volume en série. Les paramètres classiquement indépendants de la précharge étaient ainsi calculés simultanément par le logiciel et analysés a posteriori. En fin de manipulation, les animaux étaient euthanasiés.

Cytométrie en flux

Afin de préparer des suspensions cellulaires, les cœurs étaient découpés en fins morceaux et incubés dans un cocktail de collagénase I, XI, de DNase I et de hyaluronidase (Sigma-Aldrich) 1h à 37°C sur agitateur. Les cellules étaient récupérées et centrifugées (500g, 15mins, 4°C). Les rates étaient écrasées dans de l'HBSS à 4°C à l'aide du bout d'une seringue de 2mL puis filtrées sur un filtre de nylon de 70µm. La suspension cellulaire était centrifugée (300g, 10mins, 4°C). Les globules rouges étaient lysés (Red Blood Cell Lysis solution, Miltenyi) et les splénocytes lavés et resuspendus dans de l'HBSS – BSA 0,2%. Le sang était prélevé dans un tube citraté par ponction cardiaque et les globules rouges étaient lysés. Enfin, une suspension de cellules médullaires était obtenue à partir des fémurs flushés avec 1mL de HBSS après filtration (nylon, 70µm) et centrifugation (300g, 10mins, 4°C). Le nombre total de cellules viables était déterminé sur un analyseur après marquage au bleu de Trypan (Hemocytometer, BioRad).

Les suspensions cellulaires étaient incubées dans un cocktail d'anticorps anti lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ (CD4- or CD8-APC, CD3ε-PE, CD45-FITC), lymphocytes B (CD19-PE, CD45-FITC), granulocytes (CD45-FITC, Ly-6G-APC), sous-populations monocytaires (CD115-PE, Ly-6C-APC, CD45-FITC), tous les anticorps venant de chez Miltenyi. Le nombre de cellules était calculé par le produit du nombre de cellules viables et du pourcentage de cellules dans la fenêtre d'intérêt et rapporté par mg de tissu (cœur), organe (fémur et rate), ou mL (sang). Les données étaient acquises sur un cytomètre FACScalibur (BD).

Les LuMEC et MiMEC quant à elles étaient marquées à l'aide d'un anti-VEGFR-2-FITC, anti-CD146-aPC, et anti-TREM-1-PE (RnDsystems); des isotypes respectifs étaient employés comme contrôles négatifs.

PCR quantitative

Les ARN totaux étaient extraits de cellules isolées ou de tissus broyés (Qiagen Tissue Lyzer, Ø 0,3mm beads) sur colonnes (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) et quantifiés par NanoDrop (ThermoScientific) avant d'être rétro-transcrits (iScript cDNA synthesis kit, BioRad) et quantifiés par PCR quantitative (Quantitect Primer, Qiagen) pour Trem-1, Il-6, Il-10, Tnf- α , Timp-1, Mmp-9, ActB. Toutes les PCR ont été réalisées avec le MyiQ Thermal Cycler (BioRad) et quantifiées par le logiciel iQ5 (BioRad). Toutes les conditions de températures et de durée de cycle étaient conformes aux instructions des fournisseurs d'amorces (cycles d'amplifications en 3 étapes : dénaturation 10sec à 95°C, hybridation 10sec à 59°C puis élongation 10sec à 72°C). Les PCR multiplex étaient effectuées quant à elles sur PCR arrays 'innate immunity' et 'endothelial' (SABioscience). Les résultats de ces puces PCR étaient analysés par le logiciel PCR Array Data Analysis (SABioscience) et normalisés à l'aide de 5 gènes de référence.

Western Blot

Les protéines totales (tissus ou cellules) étaient extraites à l'aide du PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, UK) puis centrifugées pendant 5min à 16000g à 4°C pour collecter le surnageant. La concentration protéique était déterminée selon la méthode de Bradford (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ThermoScientific, Berbières, France). Les lysats étaient ensuite analysés par Western Blot (Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12%, BioRad, Marnes-la-Coquette, France, et membranes PVDF, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) et révélés à l'aide d'anticorps primaire et l'anticorps secondaire correspondant couplé à la HRP (Cell Signaling). Alternativement, Les phosphoprotéines étaient analysées par timbres (Phospho-Kinase array, R&Dsystems). L'acquisition et l'analyse quantitative des signaux étaient faites à l'aide du LAS-4000 imager (FSVT, Courbevoie, France) et du logiciel Multi-Gauge (LifeScience FujiFilm, France).

Mesure de la concentration des cytokines

Les concentrations des cytokines/chimiokines dans les surnageants de culture des cellules endothéliales microvasculaires et le lysat myocardique (zone infarctée et non infarctée) étaient dosées par ELISA (mouse Quantikine ELISA kit, R&Dsystems) ou à l'aide de timbres (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A, R&Dsystems) selon les

instructions du fournisseur.

Zymographie

Le principe de cette analyse consiste en une séparation électrophorétique en conditions dénaturantes des MMPs dans un gel de polyacrylamide imprégné de gélatine. La gélatinase MMP-9 est mise en évidence par sa capacité à dégrader son substrat, la gélatine B, ce qui se traduit, après coloration de la gélatine par le bleu de coomasie puis décoloration, par des bandes blanches sur fond bleu. Les échantillons étaient déposés sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS) 7,5% contenant 0,2% de gélatine B. Le SDS confère aux protéines une charge négative suffisante qui leur permet de migrer uniquement en fonction de leur poids moléculaire pendant l'électrophorèse. Après une électrophorèse à 100V pendant 2 heures, le gel était lavé dans un tampon de renaturation contenant 2,5% de Triton X-100 permettant de remplacer le SDS, sous agitation lente pendant 3 fois 20 minutes à température ambiante. Cette opération, permet de renaturer les protéines en éliminant le SDS. Les gels étaient ensuite incubés 24 heures à 37 °C dans un tampon Tris 0,5M, Brij 35 0,2%, NaCl 2M, CaCl₂ 50mM à pH 7,6, permettant la récupération de l'activité gélatinolytique des MMPs et la digestion des substrats. Les gels étaient ensuite colorés avec une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie G-250 (Biorad), 10% d'acide acétique (Merck) et 40% de méthanol (Merck) (15 minutes sous agitation lente à température ambiante), puis décolorés avec une solution contenant 10% d'acide acétique et 30% de méthanol (5 minutes sous agitation lente à température ambiante). Les MMPs étaient détectées par des bandes claires sur fond bleu pouvant être quantifiées par densitométrie et témoignant de leur activité. Une autre utilité de la zymographie est de distinguer la forme zymogène de la forme active selon leurs poids moléculaires (utilisation de marqueurs de poids moléculaires). Enfin les gels étaient conservés dans une solution contrastante (5% glycérol (Merck), 10% d'acide acétique) à 4°C jusqu'à leur séchage.

Analyses statistiques

Toutes les données, sauf indiqué, sont exprimées en moyenne \pm SD. Tous les calculs de comparaison statistiques entre groupes ont été réalisés selon le test t de Student (comparaison des données 2 à 2) ou selon le test ANOVA à 1 voie (comparaison de plusieurs (>2) groupes dans un même test). Une correction post-hoc de type Bonferroni

était appliquée en cas de comparaisons multiples. Les courbes de survie Kaplan Meier ont été analysées par le test du Log-Rank. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

RESULTATS

LR12 ATTÉNUÉ LA DÉFAILLANCE CARDIO-CIRCULATOIRE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE

Des études précédemment menées par l'équipe du laboratoire ont révélé que la diminution *in vivo* de la pression artérielle moyenne et l'augmentation de la concentration des nitrite/nitrate ainsi que de la lactatémie durant le choc septique étaient atténués par la modulation de TREM-1¹⁵⁴.

Au cours d'une péritonite expérimentale chez le rat (CLP), l'hypotension artérielle était sévère 18 heures après l'induction du sepsis (PAM : 79 ± 6 vs. 119 ± 6 mmHg, sham vs. CLP). L'administration de LR12 prévenait la survenue de cette hypotension (120 ± 3 mmHg) (Figure 16A **page 54**).

La lactatémie était élevée chez les animaux septiques ($5,9 \pm 0,7$ vs. $1,5 \pm 0,5$ mmol/L ; $p < 0,01$) mais de façon moindre chez les rats recevant LR12 ($2,3 \pm 0,1$ mmol/L, $P < 0,01$ vs LR12-scr) (Figure 16B **page 54**).

Compte tenu de ces constatations, nous avons cherché à savoir si l'amélioration de la PAM ainsi que la réduction de l'hyperlactatémie pouvaient être en rapport avec un effet sur la fonction myocardique.

Cette dernière était évaluée par cathéter de conductance 18 heures après la réalisation de la CLP.

Une altération de la fonction cardiaque systolique était présente dans le groupe CLP+LR12-scr, objectivée par une diminution de FEVG, ESPVR, dP/dt_{max} , et PRSW par rapport aux rats contrôles (sham). Le traitement des rats septiques 1 heure après l'induction du sepsis par LR12 s'associait à une amélioration de la contractilité myocardique (Figure 16C-F **page 54**). En revanche, il n'y a pas de différence significative sur les paramètres de fonction systolique dépendants des conditions de charge. Les paramètres de fonction diastolique étaient peu altérés et LR12 était sans effet significatif sur ceux-ci (Tau, EDPVR et dP/dt_{min}).

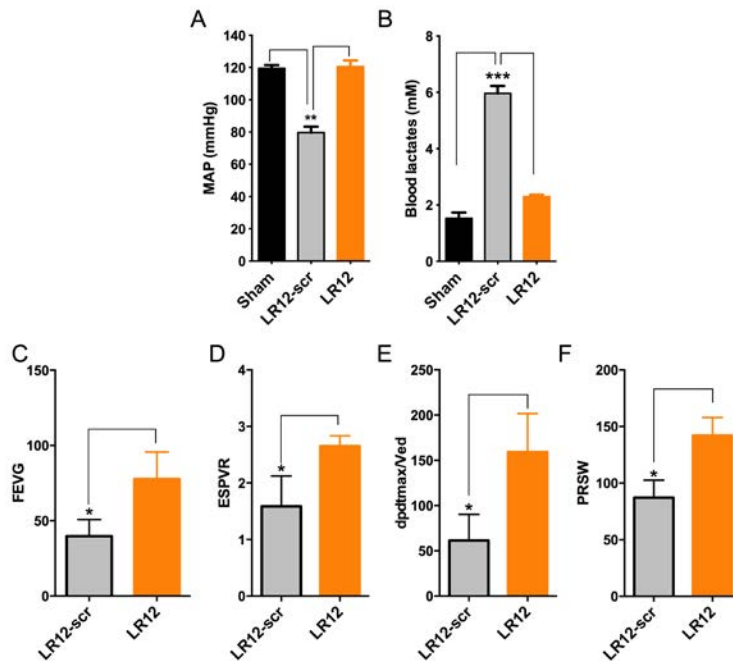


Figure 16 : LR12 atténue la défaillance cardio-circulatoire au cours du choc septique expérimental (CLP)

Une heure après réalisation d'une péritonite (CLP), les rats étaient randomisés pour recevoir du LR12 ou le peptide contrôle (LR12-scr). Après 18 heures la PAM (A) et la lactatémie (B) étaient mesurées et la fonction myocardique était évaluée par cathéter de conductance (C-F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CLP+LR12-scr. n=6/groupe

Le sepsis se caractérisant à la fois par une dysfonction cardiaque mais aussi et avant tout vasculaire, nous avons ensuite évalué l'effet du LR12 sur la réactivité vasculaire au niveau des artères de conductance (aorte thoracique) et au niveau des artères de résistance (artère mésentérique) dans deux modèles de choc septique (CLP ou LPS).

LR12 AMÉLIORE L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE

Tout d'abord, nous avons étudié l'impact de l'administration du LR12 sur la réponse contractile à la phényléphrine (Phe) ainsi que sur la relaxation à l'acétylcholine (ACh) endothélium dépendante sur des anneaux issus d'aortes thoraciques et des artères mésentériques de rats ayant subi un choc septique par péritonite (CLP).

La réponse contractile à la phényléphrine des vaisseaux aortiques et mésentériques était significativement réduite chez les rats septiques CLP+LR12-scr par rapport aux contrôles « Ctrl » (sham). Le traitement par LR12 préserve cette réponse contractile à la phényléphrine. Cette amélioration est plus significative au niveau des vaisseaux mésentériques (Figure 17A **page 56**) qu'au niveau des vaisseaux aortiques (Figure 17C **page 56**).

La relaxation endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine était sévèrement altérée chez les rats septiques, phénomène là aussi largement atténué par l'administration de LR12 (Figure 17B-D **page 56**).

Ces données suggèrent que LR12 est associé à une amélioration de la dysfonction vasculaire au cours du choc septique expérimental. Cet effet peut être le reflet d'une modulation de la réponse inflammatoire systémique (telle que précédemment décrite par notre groupe), d'une réduction de l'infiltrat inflammatoire vasculaire, comme d'une action directe sur l'endothélium.

Afin de commencer à répondre à cette question, nous avons testé l'effet de LR12 sur des vaisseaux issus d'animaux sains et stimulés *in vitro*, s'affranchissant ainsi du rôle de l'inflammation systémique et de l'infiltrat inflammatoire. La co-incubation de vaisseaux aortiques avec du LPS induisait un défaut de contraction à la Phe. De la même manière, cette hyporéactivité était induite par la stimulation directe de TREM-1 via l'utilisation d'un anticorps *agoniste* (Figure 17E **page 56**). L'atteinte contractile était corrigée par LR12 (Figure 17F **page 56**). En revanche, lorsque les vaisseaux étaient désendothélialisés, LR12 n'avait plus aucun effet (Figure 17F **page 56**). La réponse vasculaire à l'acétylcholine était également altérée en présence de LPS ou d'anticorps agoniste pour TREM-1 (α -TREM-1) (Figure 17G **page 56**). Cette atteinte était corrigée par LR12 (Figure 17G **page 56**).

Ainsi, ces données suggèrent que

- ***LR12 améliore l'hyporéactivité vasculaire induite par le sepsis***
- ***Via, au moins en partie, un effet direct sur l'endothélium***

Pour autant, l'expression de TREM-1 au niveau endothélial n'a jusqu'à présent pas été démontré de manière formelle.

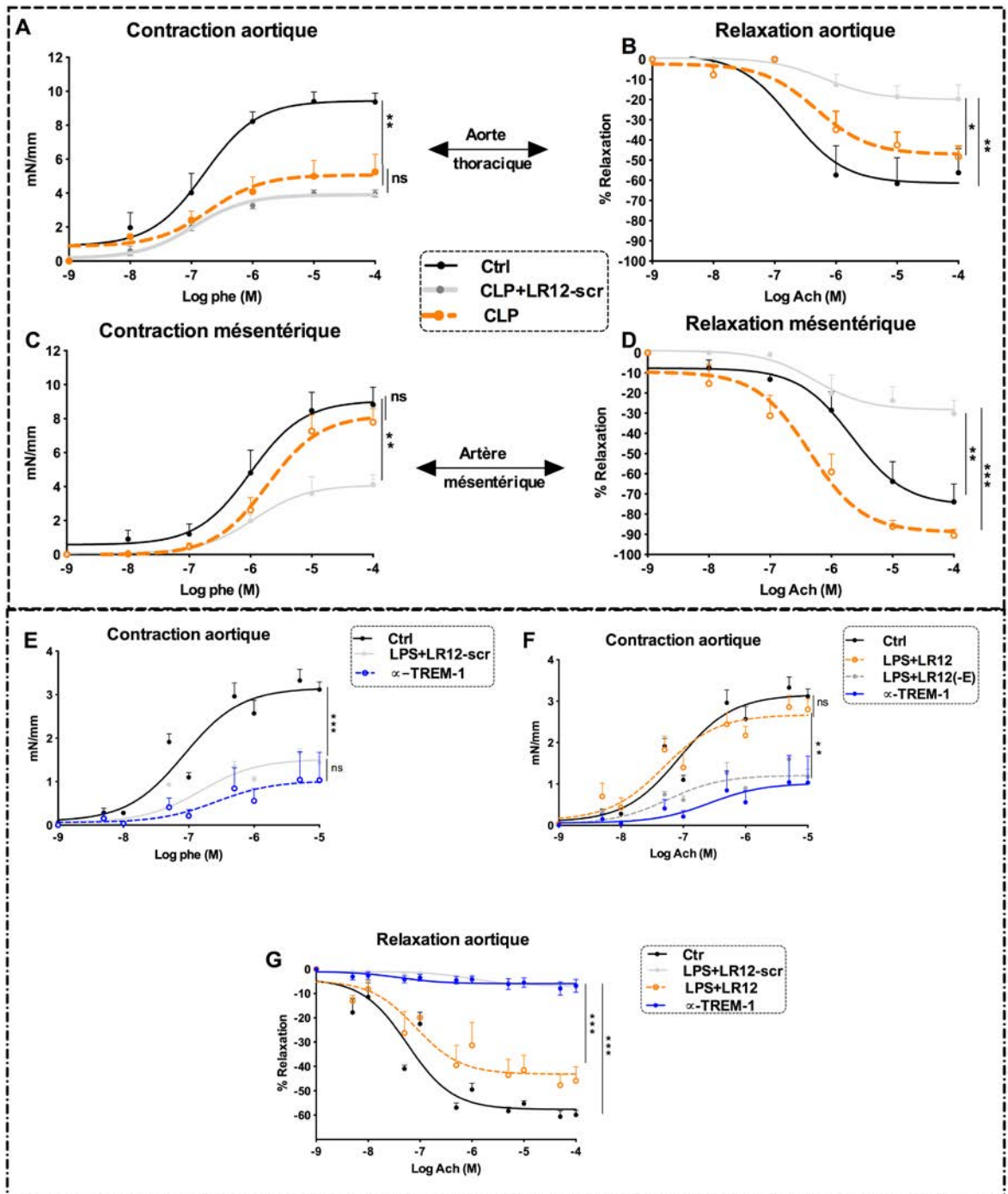


Figure 17 : LR12 améliore la dysfonction vasculaire induite par le sepsis

Une heure après réalisation d'une péritonite (CLP), les rats étaient randomisés pour recevoir du LR12 ou le peptide contrôle (LR12-scr). Après 18 heures les vaisseaux étaient prélevés et nettoyés afin d'étudier leur réponse à la phényléphrine (A, C) et à l'acétylcholine (B, D) (Myographe). Des vaisseaux issus d'animaux sains étaient désendothélialisés (E-) ou non et stimulés par du LPS (10 μ g/mL) ou par un anticorps agoniste de TREM-1 (α -TREM-1, 5 μ g/mL), en présence ou non de LR12, avant que leur réponse à la Phe et à l'Ach ne soit étudiée (E-G). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CLP+LR12-scr. n=5/groupe

TREM-1 EST EXPRIMÉ AU NIVEAU DE L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE

Nous avons étudié l'expression de Trem-1 au niveau des vaisseaux aortiques de souris et des artères mésentériques de rats. Pour cela, nous avons stimulé les vaisseaux (+/- endothélium) avec du LPS pendant 6 heures. A l'état basal TREM-1 est exprimé, quoique faiblement, au niveau vasculaire, et probablement par les cellules endothéliales. La stimulation par LPS induit une forte up-régulation de TREM-1, que ce soit au niveau aortique (Figure 18A **page 57**) ou mésentérique (Figure 18B **page 57**).

Afin de visualiser directement l'expression protéique de TREM-1 au niveau de l'endothélium vasculaire, des aortes de souris saines stimulées ou non par du LPS étaient visualisées en microscopie confocale : là encore, l'expression basale était très faible et le LPS induisait une up-régulation marquée (Figure 18C **page 57**).

Ainsi TREM-1 est-il présent au niveau de l'endothélium vasculaire et son expression est up-régulée par le LPS.

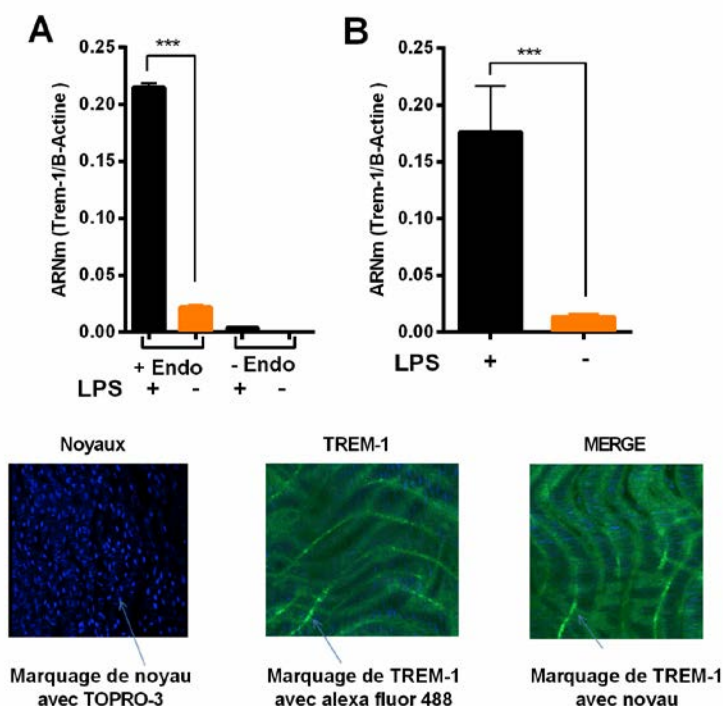


Figure 18 : TREM-1 est exprimé par les cellules endothéliales de l'aorte thoracique et de l'artère thoracique

Des anneaux vasculaires aortiques de souris (A) et mésentériques de rat (B) étaient prélevés, nettoyés et stimulés par du LPS en présence ou non de leur endothélium. L'expression de Trem-1 était déterminée par qRT-PCR (C) microscopie confocale SP5 après stimulation par LPS. ***p<0.001. n=4/groupe.

LR12 MODULE LES SIGNAUX INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DYSFONCTION VASCULAIRE INDUITE PAR LE SEPSIS

Dans notre modèle de choc septique par péritonite nous avons observé la présence d'une dysfonction vasculaire qui se traduit par une hyporéactivité vasculaire et une dysfonction endothéliale. L'administration de LR12 prévenait cette dysfonction vasculaire par amélioration de la réponse contractile et relaxante *ex-vivo*. Pour comprendre le mécanisme par lequel LR12 améliorait la dysfonction vasculaire induite par le sepsis, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation intracellulaires qui peuvent être impliquées.

Au cours du choc septique, l'existence d'une atteinte de la synthèse et de la production de certaines protéines constitutives et une surexpression de protéines inductibles a été démontrée. Les deux voies de signalisation les plus impliquées sont la voie des NOS (eNOS/AKT, iNOS) et des COX (COX-1, COX-2).

L'activation de la voie de eNOS passe par l'activation de la voie Akt : la phosphorylation de Akt permet la phosphorylation de eNOS, et ainsi son activation.

Que ce soit au niveau des vaisseaux aortiques ou mésentériques, nous avons mesuré l'expression des protéines consécutives (p)-Akt et COX-1. Dans le groupe CLP+LR12-scr une baisse des ratios p-Akt/Akt, et COX-1/ α -tubuline était observée par rapport au groupe contrôle (sham). Le traitement par LR12 corrige cette baisse, augmentant ainsi l'activité de Akt et COX-1 (Figure 19 **page 59**).

En parallèle, nous avons quantifié l'expression des protéines inductibles (iNOS, COX-2). La péritonite induisait une augmentation importante de l'expression de ces protéines, phénomène atténué par l'administration de LR12 (Figure 19 **page 59**).

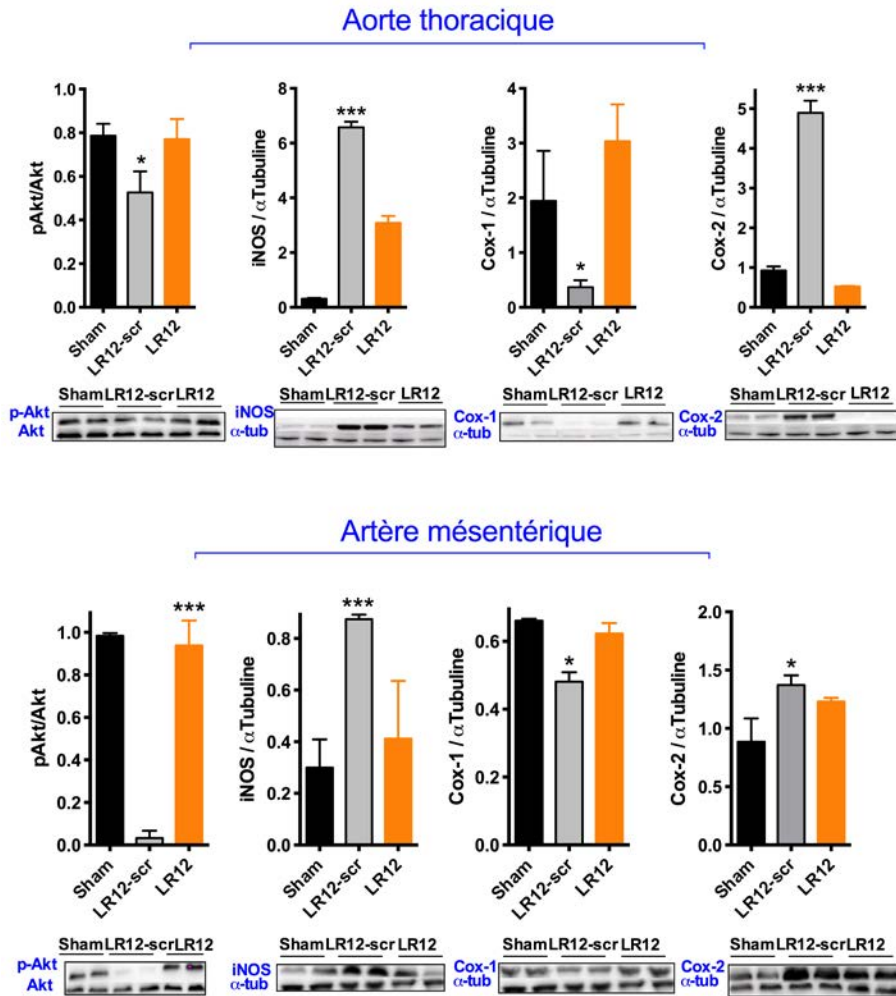


Figure 19 : LR12 module les signaux intracellulaires impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par le sepsis

Une extraction protéique totale à partir des vaisseaux aortiques et mésentériques issus de souris contrôles (sham) ou septiques (CLP) traitées ou non par LR12 était effectuée 18 heures après le début du sepsis. L'expression de (p)-Akt, iNOS, COX-1, et COX-2 était étudiée par Western-blot. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CLP+LR12-scr. n=6/groupe

TREM-1 EST EXPRIMÉ AU NIVEAU DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES PULMONAIRES ET HÉPATIQUES

Nous avons ensuite cherché à savoir si ce récepteur était exprimé au niveau de l'endothélium microvasculaire. Nous avons pu mettre en évidence par FACS que TREM-1 était exprimé au niveau des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et hépatiques (lung and liver microvascular endothelial cells : LuMEC et LiMEC ; VEGFR-2⁺ / CD146⁺) de souris saines et septiques (Figure 20A **page 61**).

Dans un second temps, nous avons montré, toujours par FACS, que TREM-1 est exprimé et up-régulé au niveau des LuMEC isolées et stimulées *in vitro* par LPS (Figure 20C-D **page 61**). La co-incubation de LR12 prévenait cette up-régulation induite par le LPS (Figure 20D **page 61**). La régulation de TREM-1 était également vérifiée au niveau génique en qRT-PCR (Figure 20E **page 61**), Tnf- α et Il-6 servant de contrôles positifs. Le LPS augmentait l'expression de Trem-1, maximale à H4 et persistant au moins 12H.

En présence de LR12, la production par les LuMEC de médiateurs importants tels que GM-CSF, KC, JE, ICAM-1, IL-6 induite par le LPS était largement atténuée, suggérant donc un rôle fonctionnel de TREM-1 au niveau de ces cellules endothéliales (Figure 21 **page 61**).

Nous avons poursuivi notre étude en évaluant la signalisation intracellulaire des LuMEC stimulées par du LPS.

Comme attendu, une up-régulation de la phosphorylation ou de l'expression de AKT, eNOS, ERK1/2, STAT3, et COX-2 était induite par le LPS : la présence de LR12 s'opposait à cette induction, témoignant de façon additionnelle de la modulation de la réponse inflammatoire par ce peptide (Figure 22 **page 62**).

- ***TREM-1 est exprimé de manière constitutive par les cellules endothéliales microvasculaires***
- ***Son expression s'accroît au cours du sepsis ou en présence de LPS***
- ***Ce récepteur semble fonctionnel***

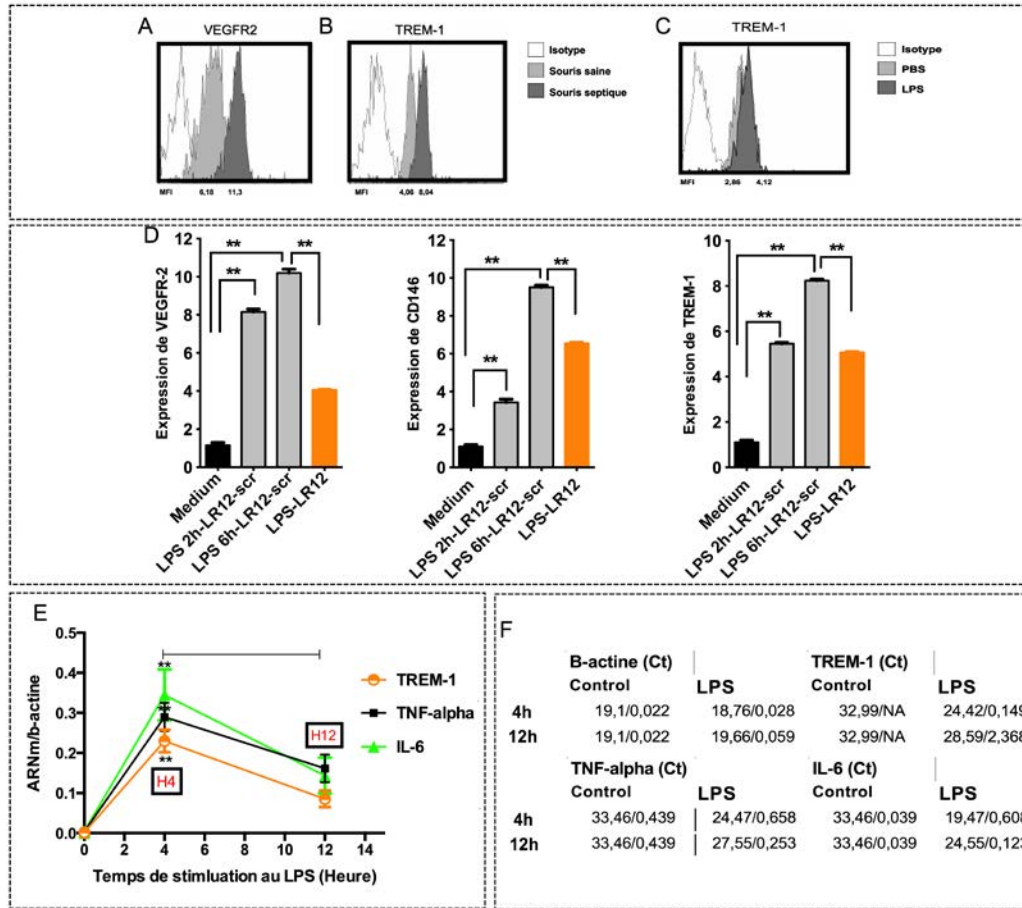


Figure 20 : TREM-1 est exprimé de manière constitutive et inducible par les LuMEC

Les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et hépatiques (VEGFR-2⁺, CD146⁺) isolées de souris saines ou septiques étaient étudiées en cytométrie en flux: (A, B) l'expression de TREM-1 est constitutive et up-régulée au cours du sepsis expérimental (CLP) ou (C) par 1 heure de stimulation par LPS. (D) Cinétique d'expression de TREM-1, VEGFR-2 et CD146 en présence de LPS. (E, F) Cinétique d'expression génique de Trem-1, Tnf- α , et Il-6 par les LuMEC en présence de LPS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. n=4/groupe.

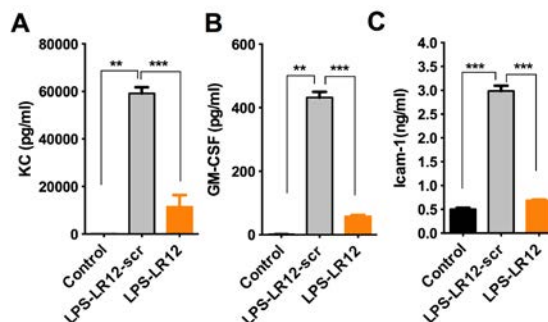


Figure 21 : Effet de LR12 sur la production de cytokines par les LuMEC en présence de LPS

Après 24 heures de stimulation des LuMEC par du LPS, les concentrations de KC, GM-CSF, et ICAM-1 étaient déterminées dans le surnageant par ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. n=4/groupe.

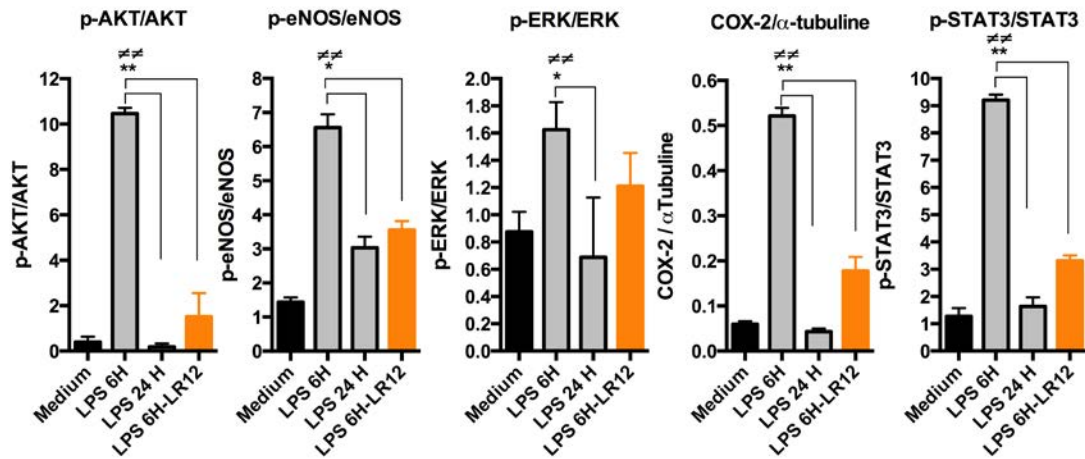


Figure 22 : LR12 module la signalisation intracellulaire des LuMEC induite par le LPS

Une extraction protéique totale à partir des LuMEC stimulées par LPS en présence ou non de LR12 était effectuée et l'expression de différentes protéines étudiée en Western-blot.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS 4H ; $\# p < 0.05$, $\#\# p < 0.01$ vs médium. n=6/groupe

Ainsi TREM-1 est-il impliqué dans la défaillance cardio-circulatoire et la dysfonction endothéliale induite par le sepsis.

Considérant les grandes similitudes physiopathologiques entre sepsis et infarctus du myocarde et le rôle de TREM-1 déjà établi au cours de pathologies inflammatoires d'origine non-infectieuse, nous avons cherché dans la seconde partie de ce travail à évaluer l'implication éventuelle de cet immuno-récepteur au cours de l'infarctus myocardique expérimental.

TREM-1 EST EXPRIMÉ DANS LE MYOCARDE ET EST UP-RÉGULÉ DURANT L'ISCHÉMIE CARDIAQUE

Afin de d'objectiver la présence de TREM-1 au niveau cardiaque, nous avons prélevé le cœur à différents temps (H0, H6, H24, H96, H168) après une ligature permanente (IP) de la coronaire gauche chez la souris. Le ventricule gauche (VG) est découpé en 2 parties correspondant aux zones ischémiques et non ischémiques telles que déterminées après coloration par TTC.

Si l'expression génique basale de Trem-1 était très faible, l'ischémie myocardique induisait une très nette up-régulation dans la zone ischémique, l'expression dans la zone non-ischémique ne variant que peu (Figure 23 **page 63**). L'expression était maximale à 24 heures puis retournait progressivement au niveau basal. Ces données étaient confirmées au niveau protéique (FACS).

Le traitement des animaux par LR12 prévenait en partie cette up-régulation de TREM-1 (Figure 23 **page 63**).

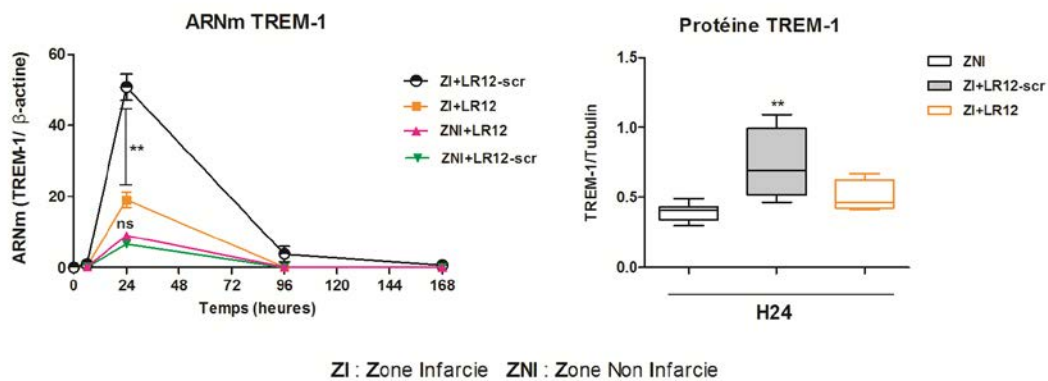


Figure 23 : TREM-1 est exprimé dans le myocarde et est up-régulé durant l'ischémie cardiaque

Quantification et cinétique d'expression génique et protéique de TREM-1 au niveau cardiaque au cours d'un infarctus du myocarde (qRT-PCR, Western Blot). Après réalisation de la ligature coronaire gauche, les souris étaient randomisées pour recevoir du LR12 pendant 5 jours ou le peptide contrôle (LR12-scr). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6$ /groupe.

LR12 AMÉLIORE LA SURVIE DES ANIMAUX APRÈS INFARCTUS DU MYOCARDE

Compte tenu de la présence d'une expression importante de TREM-1 au niveau du myocarde ischémique, nous avons souhaité évaluer les effets de sa modulation par LR12 au cours de l'IDM. Les animaux étaient randomisés après réalisation de la ligature permanente de la coronaire gauche pour recevoir une injection quotidienne de LR12 ou du peptide contrôle (LR12-scr). La survie était monitorée pendant 15 jours. L'administration de LR12 améliorait significativement la survie (90% vs. 70% chez les animaux contrôles, $p < 0.01$). A noter que tous les décès observés étaient précoces (dans les 3 premiers jours), aucun ne survenant de manière plus tardive (Figure 24 **page 64**).

A l'inverse, la mortalité était majorée lorsque les souris recevaient une injection d'anticorps *agoniste* pour TREM-1 (30% de survie).

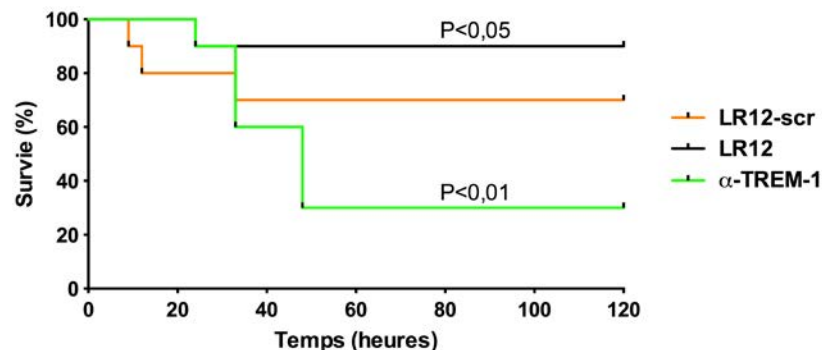


Figure 24 : LR12 améliore la survie au cours de l'IDM

Des souris adultes Balb/c (n=15 par groupe) subissaient une ligature de l'artère coronaire gauche puis recevaient LR12, LR12-scr, ou un agoniste de TREM-1 (α -TREM-1) en i.p. pendant 5 jours. La survie était monitorée pendant 2 semaines et analysée par le test du Log Rank. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. vs animaux contrôles (LR12-scr).

Les mécanismes par lesquels la modulation de TREM-1 par LR12 conférait une protection aux animaux lors de l'infarctus du myocarde ont alors été étudiés.

EFFET DE LR12 SUR LA TAILLE DE LA ZONE INFARCTE

La taille de la zone à risque et de la zone ischémique était déterminée 24 heures après la réalisation de l'infarctus. L'administration de LR12 était sans effet sur la taille de la zone à risque (AAR). En revanche, la taille relative de la zone ischémique était réduite (Figure 25 page 64).

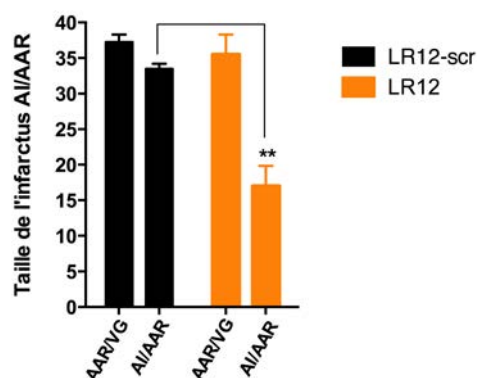


Figure 25 : Effet de LR12 sur l'étendue de l'ischémie au cours de l'IDM

La taille de l'infarctus (AI) est exprimée en pourcentage par rapport à l'aire à risque (AI/AAR) et la taille de l'AAR est exprimée en pourcentage par rapport à la taille du ventricule gauche (VG) (AAR/VG). *p<0.005, **p<0.01, ***p<0.01

TREM-1 RÉGULE LE RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE MYOCARDIQUE

L'ischémie myocardique induit un recrutement précoce de neutrophiles, largement responsables de la genèse de la première phase de la réponse inflammatoire. Celle-ci fait également rapidement appel à une sous-population monocytaire (Ly-6C^{high}) responsable de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Quelques temps après, une population monocytaire ayant un rôle plutôt de résolution de l'inflammation apparaît. L'importance du recrutement neutrophile/monocytes Ly-6C^{high} au détriment des monocytes Ly-6C^{low} va conditionner l'étendue des dommages tissulaires et l'importance du remodelage ventriculaire.

L'administration de LR12 s'associait à une réduction majeure du recrutement des neutrophiles et monocytes Ly-6C^{high} sans compromettre la mobilisation des monocytes Ly-6C^{low} (Figure 26 page 65).

La mise en jeu de l'immunité adaptative, même si elle reste un peu moins bien comprise, joue également un rôle important dans la cicatrisation myocardique. En particulier, les lymphocytes B (LB) et T8 ont probablement un effet néfaste, alors que les lymphocytes T4 sont plutôt considérés comme 'protecteurs'. De manière surprenante, et alors que les lymphocytes n'expriment pas TREM-1, l'administration de LR12 réduisait l'infiltration myocardique des LB et des LT8, tout en majorant le recrutement des LT4 (Figure 26 page 65).

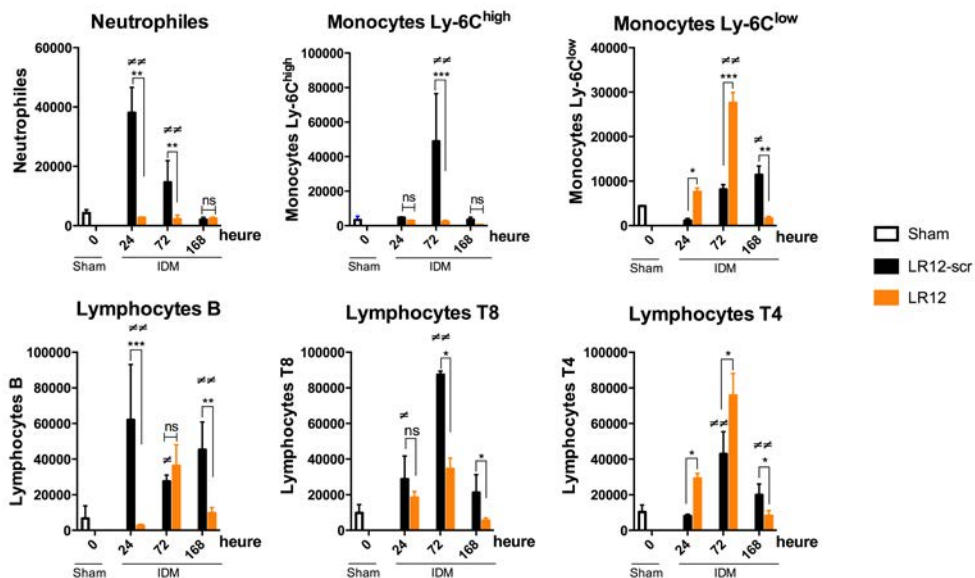


Figure 26 : LR12 module le recrutement leucocytaire myocardique au cours de l'IDM

Les cellules myocardiques étaient isolées et étudiées en FACS à différents temps après l'infarctus. n=5/groupe. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. † p < 0.05, †† p < 0.01, ††† p < 0.001 vs Sham

LR12 MODULE L'ACTIVATION LEUCOCYTAIRE

La modulation de TREM-1 s'associant à un recrutement leucocytaire myocardique moindre, nous avons voulu évaluer le degré d'activation des cellules recrutées.

Nous avons d'abord observé que l'administration de LR12 réduisait la phosphorylation de p38-MAPK et ERK1/2 ainsi que l'expression de iNOS et COX-2 et augmentait la phosphorylation de GSK-3 β . En revanche, LR12 augmentait l'activation de plusieurs protéines responsables d'une modulation de l'inflammation ou de l'augmentation de la survie des cardiomyocytes (eNOS, AKT, SOCS3) (Figure 27 **page 67**).

Parmi les 168 gènes impliqués dans l'immunité innée ou la fonction endothéliale que nous avons ensuite examinés, l'expression de 156 d'entre eux varie au cours de l'infarctus, particulièrement à 24 heures. LR12 modulait cette activation génique induite par l'IDM (Figure 28A **page 68**).

En particulier, l'expression de nombreuses cytokines / chimiokines était réduite, de même celle de Trem-1. Une qRT-PCR sur certains gènes confirmait ces données de PCR-array (Figure 28B **page 68**).

L'effet constaté au niveau du transcriptome se traduisait également au niveau protéique puisque les concentrations tissulaires de nombreuses cytokines / chimiokines étaient réduites par LR12 (IL-6, IL-13, IL-17, IL-27, IL-6, ICAM-1 IFN γ , MIP-2, JE) (Figure 28C **page 68**).

Ainsi donc, la modulation de TREM-1 via LR12 s'associe à

- ***Une réduction du recrutement cellulaire inflammatoire myocardique***
- ***Une réduction de l'activation leucocytaire myocardique***

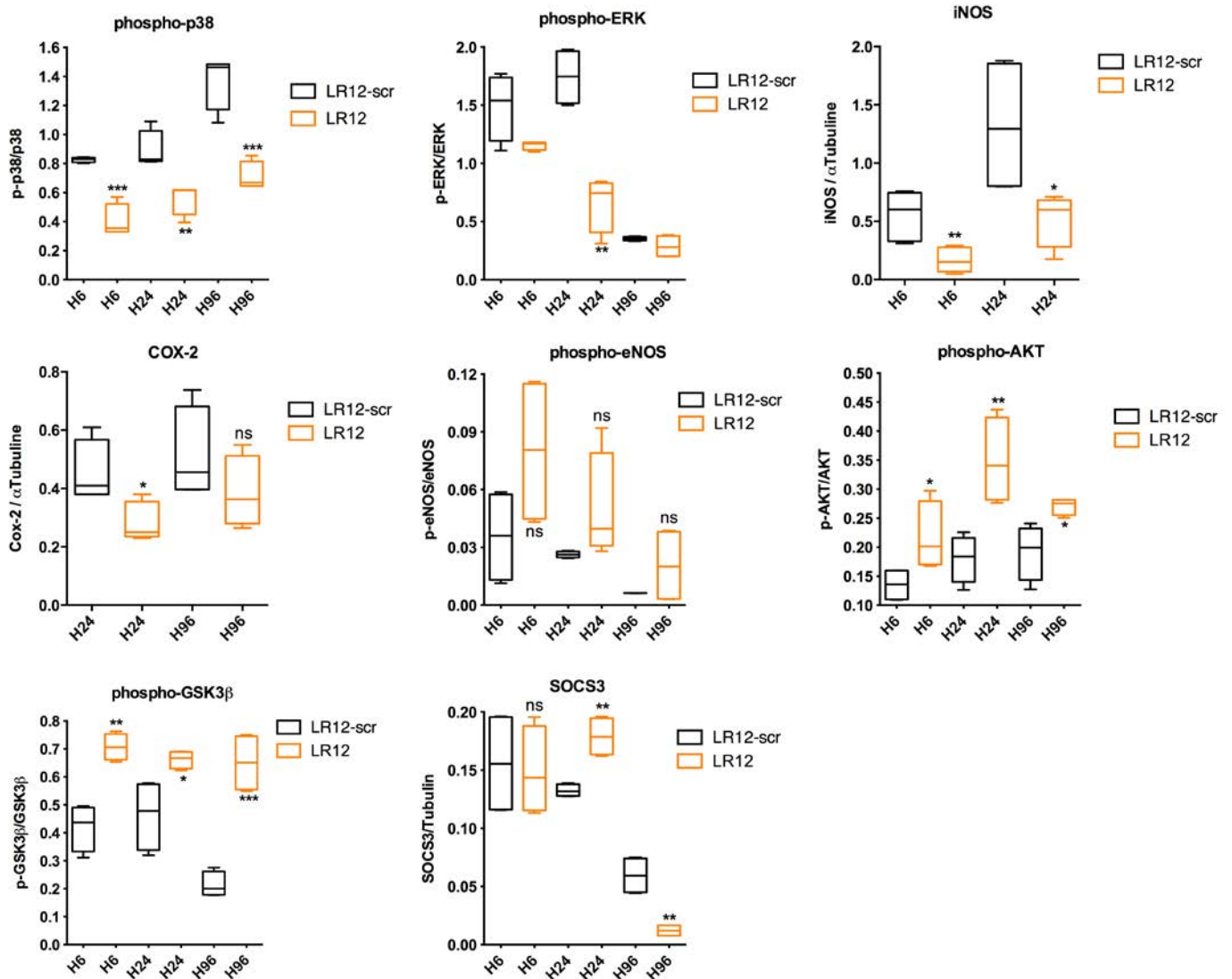
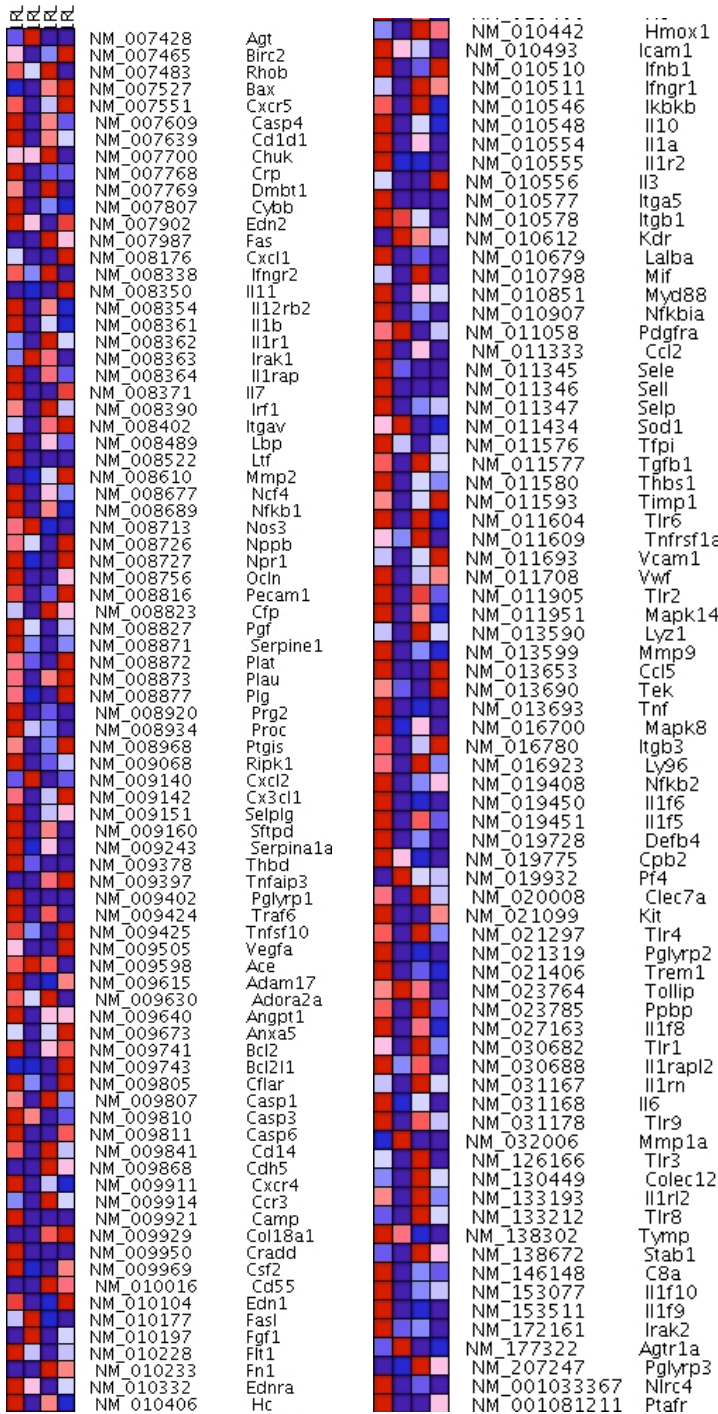


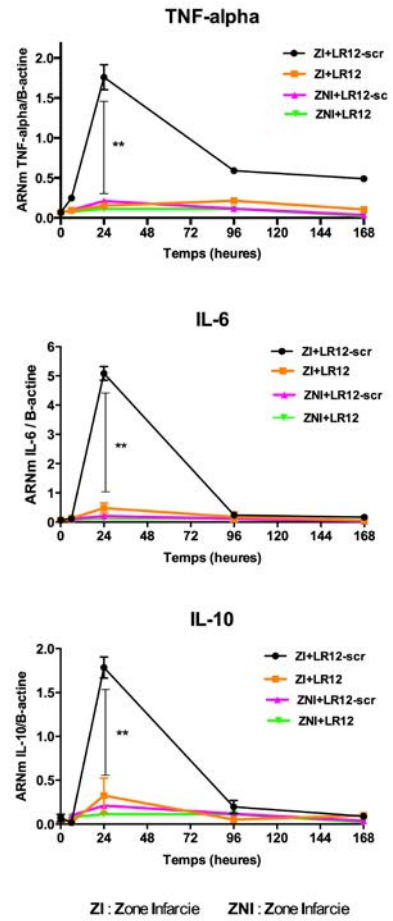
Figure 27 : Effet de LR12 sur plusieurs voies de signalisation impliquées au cours de l'IDM

Une extraction protéique totale à partir des cœurs des souris ayant subi une ligature coronaire permanente (H6, H24, H96) traitées soit par LR12-scr ou par LR12 était effectuée et l'expression de différentes protéines étudiée en Western-blot.
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. n=6/groupe

A



B



C

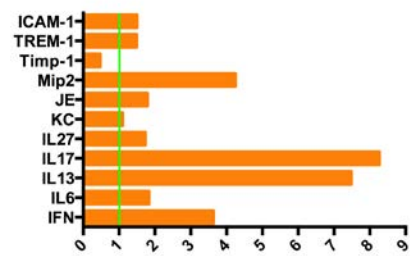


Figure 28 : Effet de LR12 sur la réponse myocardique génique et protéique

(A) Heat Map d'expression génique des médiateurs de l'immunité innée (PCR array). Colonnes 1&3 : LR12-scr H24&H96 ; Colonnes 2&4 : LR12 H24&H96. (B) qRT-PCR. (C) ELISA. n=5/groupe. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs LR12-scr

LR12 DIMINUE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE DANS LES ZONES ISCHÉMIQUES AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

L'activité protéasique est responsable pour une large part de l'étendue du remodelage ventriculaire délétère qui fait suite à une ischémie myocardique. Déterminant cette activité protéasique, 2 enzymes sont particulièrement impliquées : MMP-9 (activité protéasique) et TIMP-1 (activité anti-protéasique).

L'expression de Mmp-9 est fortement up-régulée au cours de l'IDM dans la zone ischémique, avec un pic d'expression à 24 heures. Parallèlement, Timp-1 est peu exprimée et la balance Mmp-9/Timp-1 est donc fortement positive. En revanche, l'administration de LR12 inverse totalement cette tendance (Figure 29 page 69).

Nous avons ensuite analysé en zymographie l'activité catalytique reflétant cette balance : comme attendu, cette activité était réduite par LR12 (Figure 29 page 69).

- ***LR12 réduit donc l'activité protéasique myocardique ce qui pourrait conduire à une diminution du remodelage ventriculaire au décours de l'IDM***

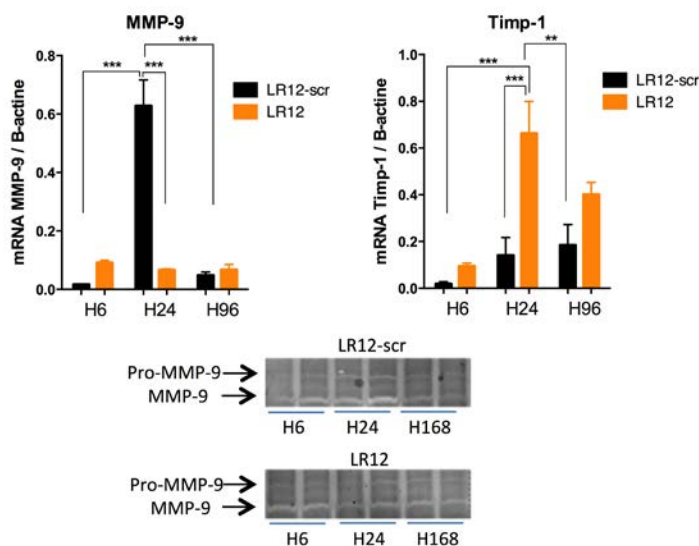


Figure 29 : LR12 diminue l'activité protéasique dans les zones ischémiques au cours de l'infarctus du myocarde

Au décours d'un IDM, l'expression génique de Mmp-9 et de Timp-1 était déterminée par qRT-PCR et l'activité protéasique nette par zymographie. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 5$ /groupe.

TREM-1 CONTRÔLE LE TRAFIC LEUCOCYTAIRE À DISTANCE

Puisque TREM-1 semble important dans la régulation du recrutement leucocytaire au niveau du myocarde ischémique, nous avons étudié son rôle dans le trafic leucocytaire à distance.

Faisant suite à un infarctus du myocarde, les monocytes sortent de la rate au cours des 24 premières heures pour aller infiltrer le myocarde. Ce phénomène était effectivement observé ici avec une décroissance rapide du contenu monocytaire splénique persistant au moins une semaine. De manière concomitante, une monocytose circulante se développait dès 72 heures accompagnée d'une accumulation médullaire progressive (Figure 30 **page 71**). La modulation de TREM-1 s'opposait quasi totalement à cette déplétion splénique et au développement de la monocytose.

Le taux de neutrophiles circulants s'élevait à 72 heures et retrouvait son niveau basal à 1 semaine. Cette neutrophilie n'était pas observée chez les animaux traités par LR12. La rate ne semblait pas contribuer à la production/stockage des neutrophiles. Une accumulation médullaire progressive et modeste était observée sans effet du traitement.

Le nombre de lymphocytes B, T4 et T8 était précocement réduit dans la rate et une lymphopénie T4 et T8 survenait. A l'inverse, une lymphocytose était présente à la 72^{ème} heure avant de disparaître à 1 semaine. Ces modifications du trafic lymphocytaire étaient atténuées par LR12.

Les chimiokines MCP-1 (ou CCL2) et MCP-3 (ou CCL7) sont impliquées dans la mobilisation respectivement des monocytes Ly-6C^{high}, Ly-6C^{low}, et des lymphocytes vers le site inflammatoire. Les concentrations plasmatiques de MCP-1, KC, siCAM et MCP-3 étaient élevées 24 heures après l'IDM. Les concentrations de MCP-1, KC, siCAM et MCP-3 étaient réduites chez les souris traitées par LR12 (Figure 31 **page 71**).

Puisque TREM-1 est impliqué dans l'atteinte endothéliale et myocardique, nous avons mesuré son taux plasmatique. Les résultats obtenus montrent exactement le même profil qu'au niveau génique avec un pic à H24. LR12 diminue cette surproduction de la forme soluble de TREM-1 (Figure 31 **page 71**).

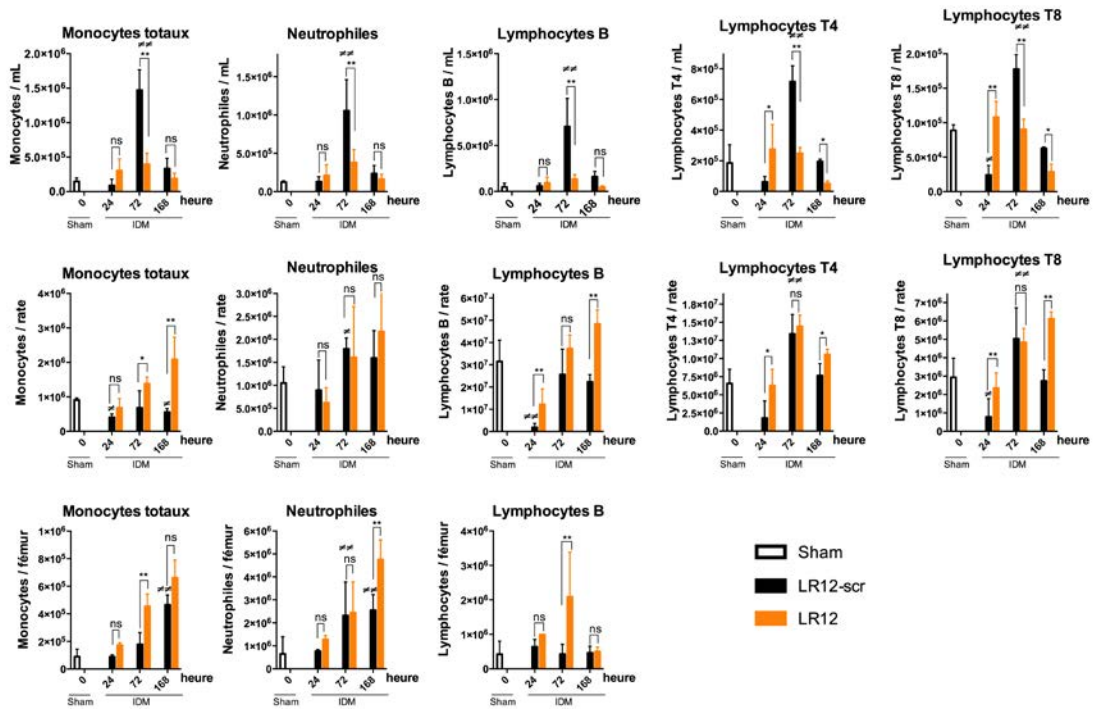


Figure 30 : TREM-1 contrôle le trafic leucocytaire à distance au cours de l'infarctus du myocarde

Nombre et type de leucocytes présents dans le sang, la rate et la moelle au cours d'un infarctus du myocarde déterminés en FACS. n=5/groupe. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. † p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 vs Sham

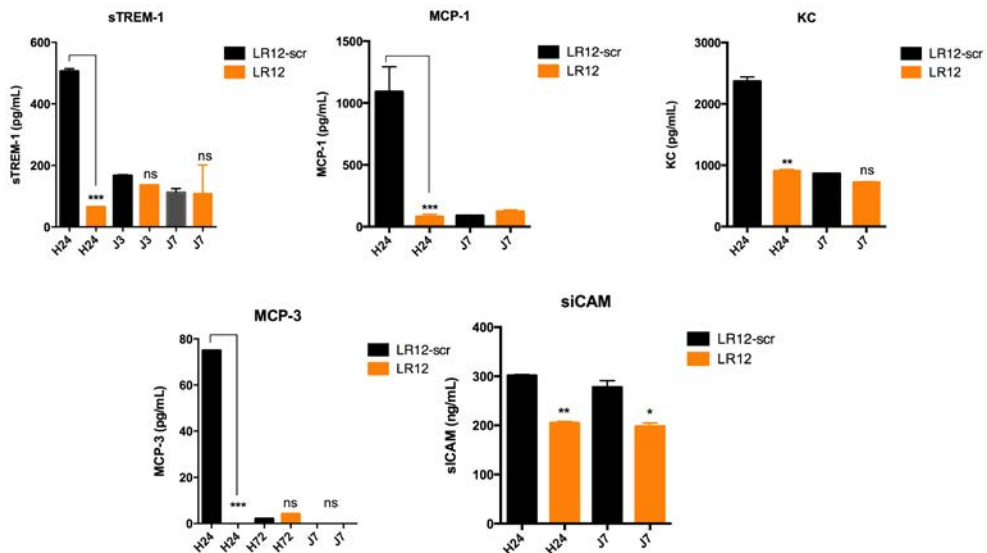


Figure 31 : Effets de LR12 sur la production de chimiokines et de sTREM-1

ELISA sur plasma des souris traitées par LR12-scr ou LR12. n=4/groupe. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Ainsi la modulation de TREM-1 chez la souris réduit le recrutement et l'activation inflammatoire, réduit l'activité protéasique, et finalement améliore la survie. Néanmoins, ces données ne renseignent pas sur la fonction myocardique. Celle-ci étant difficilement évaluable de manière très précise chez la souris, nous avons choisi de l'étudier chez le rat à la fois en imagerie (PET-scan) et par cathéter de conductance.

Imagerie et randomisation durant l'ischémie permanente : (Rat)

Une analyse complète de la fonction cardiaque comprenant deux PET-scan a pu être réalisée chez 35 rats, répartis en deux groupes (17 rats traités par LR12 et 18 rats par LR12-scr). En ce qui concerne l'évaluation invasive de la fonction cardiaque par cathéter de conductance, une analyse complète a pu être menée à son terme chez 14 rats sur les 18 que comprenait le groupe contrôle (LR12-scr), en raison d'un échec de cathétérisation du ventricule gauche et de trois décès par fibrillation ventriculaire, et chez 15 rats traités (LR12) sur 17 en raison d'un échec de cathétérisation et d'une fibrillation ventriculaire.

Lors de la réalisation du premier PET-scan, juste après la réalisation de l'IDM, tous les paramètres évalués étaient comparables entre les deux groupes (LR12-scr et LR12), notamment les paramètres morphologiques (poids) et hémodynamiques (fréquence cardiaque et pression artérielle systolique). La fraction d'éjection était également similaire dans les deux groupes, mesurée à 48%, correspondant à une atteinte représentant 1/5^{ème} de la surface du ventricule gauche. La géométrie du VG était comparable entre les deux groupes en ce qui concerne les volumes télédiastolique et télésystolique.

Lors du contrôle tomoscintigraphique à 6 semaines, le volume ventriculaire gauche télédiastolique était significativement plus faible dans le groupe traité par LR12 (**VTD $694 \pm 100\mu\text{L}$ vs $631 \pm 167\mu\text{L}$** ($p = 0,05$)) avec une tendance à la diminution du volume télésystolique (**VTS $354 \pm 85\mu\text{L}$ vs $311 \pm 135\mu\text{L}$** ($p = 0,08$) pour le VTS). Aucuns des autres paramètres étudiés ne présentaient de différence significative (Table 1 **page 73**).

	LR12-scr	LR12	p
PET-SCAN N°1			
Poids (g)	303 ± 42	313 ± 51	0.32
PAS (mmHg)	134 ± 15	136 ± 17	0.76
FC (bpm)	378 ± 39	400 ± 26	0.07
Surface IDM (%VG)	23 ± 9	22 ± 11	0.88
Surface IDM (mm ²)	57 ± 27	54 ± 30	0.88
VTD (μL)	431 ± 75	417 ± 92	0.30
VTS (μL)	223 ± 51	215 ± 62	0.23
FE (%)	48 ± 8	48 ± 9	0.81
PET-SCAN N°2			
Poids (g)	447 ± 28	426 ± 49	0.26
- Δ PET-scan n°1	144 ± 44	113 ± 51	0.053
PAS (mmHg)	135 ± 15	136 ± 17	0.76
- Δ PET-scan n°1	-9 ± 23	-12 ± 26	0.37
FC (bpm)	370 ± 43	387 ± 25	0.12
- Δ PET-scan n°1	-6 ± 31	-8 ± 22	0.91
Surface IDM (%VG)	15 ± 9	16 ± 11	0.81
- Δ PET-scan n°1	-8.2 ± 5.9	-6.0 ± 8.1	0.11
Surface IDM (mm ²)	48 ± 29	49 ± 40	0.81
- Δ PET-scan n°1	-9 ± 20	-5 ± 23	0.11
VTD (μL)	694 ± 100	631 ± 167	0.05
- Δ PET-scan n°1	273 ± 77	198 ± 95	0.007
VTS (μL)	354 ± 85	311 ± 135	0.08
- Δ PET-scan n°1	143 ± 60	99 ± 80	0.062
FE (%)	49 ± 7	50 ± 8	0.61
- Δ PET-scan n°1	0 ± 8	2 ± 7	0.44
Table 1. Ischémie permanente : micro-TEP			
Résultats obtenus par PET-scan. PAS, pression artérielle systolique ; FC, fréquence cardiaque ; IDM, infarctus du myocarde ; VTD, volume télédiastolique du ventricule gauche ; VTS, volume télésystolique du ventricule gauche ; Δ, variation entre les deux examens tomoscintigraphiques. Moyenne ± écart-type.			

LR12 AMÉLIORE LES PARAMÈTRES SYSTOLIQUES ET DIASTOLIQUES APRÈS UNE ISCHÉMIE PERMANENTE MYOCARDIQUE (RAT)

L'étude de la fonction cardiaque réalisée par cathéter de conductance chez les rats ayant subi une ischémie myocardique permanente ne permettait pas de retrouver de différence significative entre les deux groupes à l'état basal.

Il semblait exister une tendance à la diminution des volumes ventriculaires télédiastolique et télésystolique chez les rats traités par LR12, mais aucun paramètre n'atteignaient le seuil de significativité (**VTD 182 ± 70 vs 117 ± 74 , $p = 0,07$ et VTS 131 ± 51 vs 93 ± 57 , $p = 0,09$ chez les rats contrôles (IDM+LR12-scr) en comparaison aux rats traités par LR12). Les paramètres recueillis lors de l'occlusion de la VCI mettaient en évidence une amélioration de la fonction systolique ventriculaire gauche avec notamment une amélioration significative des paramètres PRSW et Ees (Table 2 **page 74**).**

	LR12-scr	LR12	p
ETAT BASAL			
PAS (mmHg)	131 ± 23	134 ± 27	0,98
PAD (mmHg)	99 ± 15	99 ± 20	0,93
Pmax (mmHg)	127 ± 23	124 ± 18	0,83
FC (bpm)	411 ± 43	420 ± 28	0,41
Debit cardiaque (mL.min-1)	34 ± 15	31 ± 15	0,50
dP/dtmax (mmHg.s-1)	8725 ± 2684	8361 ± 1805	0,98
dP/dtmin (mmHg.s-1)	-6999 ± 2051	-7280 ± 1882	0,54
VTD (µL)	182 ± 70	117 ± 74	0,07
VTS (µL)	131 ± 51	93 ± 57	0,09
FE (%)	48 ± 19	58 ± 22	0,18
Tau	7,4 ± 0,8	7,2 ± 0,5	0,56
OCCCLUSION VCI			
PRSW (mmHg.µL-1)	55 ± 23	80 ± 34	0,03
Ees (mmHg.µL-1)	0,98 ± 0,43	1,45 ± 0,49	0,04
E _{max}	3,3 ± 1,5	3,7 ± 1,1	0,20
EDPVR (mmHg.µL-1)	0,10 ± 0,09	0,12 ± 0,07	0,33

Table 2. Ischémie permanente : cathéter de conductance

Pmax, pression ventriculaire gauche maximale ; FC, fréquence cardiaque ; dP/dtmax, dérivée première de la pression développée au cours de la contraction isovolumétrique ; dP/dtmin, dérivée première de la pression développée au cours de la relaxation isovolumétrique ; Tau, constante de relaxation ; PRSW, preload recruitable stroke work ; Ees, pente de l'end systolic pressure-volume relationship. Moyenne ± écart-type.

Imagerie et randomisation durant l'ischémie transitoire (Rat)

Une étude similaire était réalisée chez des rats ayant subi une ischémie myocardique transitoire (1 heure de ligature) afin d'étudier l'effet de LR12 au cours du phénomène d'ischémie-reperfusion.

L'analyse tomoscintigraphique complète a été réalisée chez 19 rats dont 10 rats dans le groupe contrôle (IDM+LR12-scr) et 9 rats dans le groupe traité par LR12.

L'analyse par cathéter de conductance a pu être effectuée chez 17 rats répartis en 9 rats contrôle (LR12-scr) et 8 rats traités par LR12.

Les différents paramètres évalués par tomoscintigraphie n'ont pas révélé de différence significative entre les deux groupes considérés. Contrairement à la phase d'ischémie permanente, il n'y avait notamment pas d'augmentation significativement plus importante du volume télédiastolique chez les rats traités par LR12-scr. Il est à noter que, bien que la surface de l'infarctus mesurée à J0 soit importante (**42 ± 28%** du VG dans le groupe contrôle (LR12-scr) et **41 ± 20%** dans le groupe traité par LR12, soit près du double de la surface constatée à J0 chez les rats ayant subi une ischémie permanente), celle-ci devient quasi négligeable après 6 semaines d'évolution (**5 ± 10%** du VG dans le groupe contrôle (LR12-scr) et **3 ± 9%** dans le groupe traité par LR12, **p = 0,63**) (Table 3 page 76).

	LR12-scr	LR12	p
PET-SCAN N°1			
Poids (g)	410 ± 1	391 ± 9	0.53
PAS (mmHg)	136 ± 4	134 ± 2	0.10
FC (bpm)	338 ± 42	343 ± 43	0.78
Surface IDM (%VG)	42 ± 28	41 ± 20	0.90
VTD (µL)	486 ± 74	511 ± 55	0.41
VTS (µL)	270 ± 59	251 ± 75	0.56
FE (%)	44 ± 7	47 ± 6	0.47
PET-SCAN N°2			
Poids (g)	459 ± 63	439 ± 12	0.37
- Δ PET-scan n°1	49 ± 18	48 ± 10	0.17
PAS (mmHg)	170 ± 5	167 ± 6	0.16
- Δ PET-scan n°1	34 ± 3	33 ± 6	0.73
FC (bpm)	350 ± 55	370 ± 25	0.36
- Δ PET-scan n°1	12 ± 23	27 ± 22	0,28
Surface IDM (%VG)	5 ± 10	3 ± 9	0,63
- Δ PET-scan n°1	-37 ± 15	38 ± 8	0,61
VTD (µL)	560 ± 58	620 ± 34	0,11
- Δ PET-scan n°1	74 ± 37	109 ± 55	0,13
VTS (µL)	251 ± 50	273 ± 47	0,18
- Δ PET-scan n°1	-19 ± 8	22 ± 18	0,47
FE (%)	55 ± 8	56 ± 5	0,73
- Δ PET-scan n°1	11 ± 8	8 ± 7	0,74
Table 3. Ischémie-reperfusion : micro-TEP			
Moyenne ± écart-type			

LR12 AMÉLIORE LA FONCTION CARDIAQUE APRÈS UNE ISCHÉMIE TRANSITOIRE :

Les paramètres hémodynamiques de base, tels que pressions artérielles systolique et diastolique, pression maximale intraventriculaire gauche, fréquence cardiaque ou débit cardiaque n'étaient pas différents d'un groupe à l'autre lors de l'analyse invasive par cathéter de conductance. L'analyse de la fonction diastolique ne révélait pas de modification significative lors de l'administration du peptide LR12.

Le dp/dtmin, la constante de relaxation tau ou l'EDPVR étaient comparables dans les deux groupes. En ce qui concerne la fonction systolique, les paramètres les plus dépendants des

conditions de charge ne mettaient pas en évidence d'amélioration significative entre les deux groupes. En revanche, les paramètres réputés indépendants des conditions de charge que sont la pente Ees et PRSW étaient significativement améliorés chez les rats traités par LR12. Le paramètre Emax révélait également une tendance à l'amélioration. Les résultats sont repris dans le tableau (Table 4 page 77) et un exemple d'analyse apparaît (Figure 32 page 78).

	LR12-scr	LR12	p
ETAT BASAL			
PAS (mmHg)	146 ± 27	128 ± 22	0,11
PAD (mmHg)	103 ± 27	90 ± 17	0,13
Pmax (mmHg)	136 ± 20	109 ± 47	0,09
FC (bpm)	407 ± 31	404 ± 25	0,96
Debit cardiaque (mL.min ⁻¹)	36 ± 19	39 ± 10	0,61
dP/dtmax (mmHg.s ⁻¹)	8864 ± 1951	8260 ± 1952	0,42
dP/dtmin (mmHg.s ⁻¹)	-8576 ± 1946	-7914 ± 1509	0,48
VTD (µL)	152 ± 55	176 ± 75	0,81
VTS (µL)	120 ± 48	118 ± 64	0,81
FE (%)	51 ± 21	56 ± 15	0,61
Tau	7,4 ± 0,6	7,4 ± 0,4	0,96
OCCLUSION VCI			
PRSW (mmHg.µL ⁻¹)	64 ± 25	96 ± 26	0,02
Ees (mmHg.µL ⁻¹)	1,00 ± 0,30	1,61 ± 0,69	0,05
Emax	2,93 ± 0,88	4,29 ± 2,16	0,07
EDPVR (mmHg.µL ⁻¹)	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,07	0,61
Table 4. Ischémie-reperfusion : cathéter de conductance			
Moyenne ± écart-type			

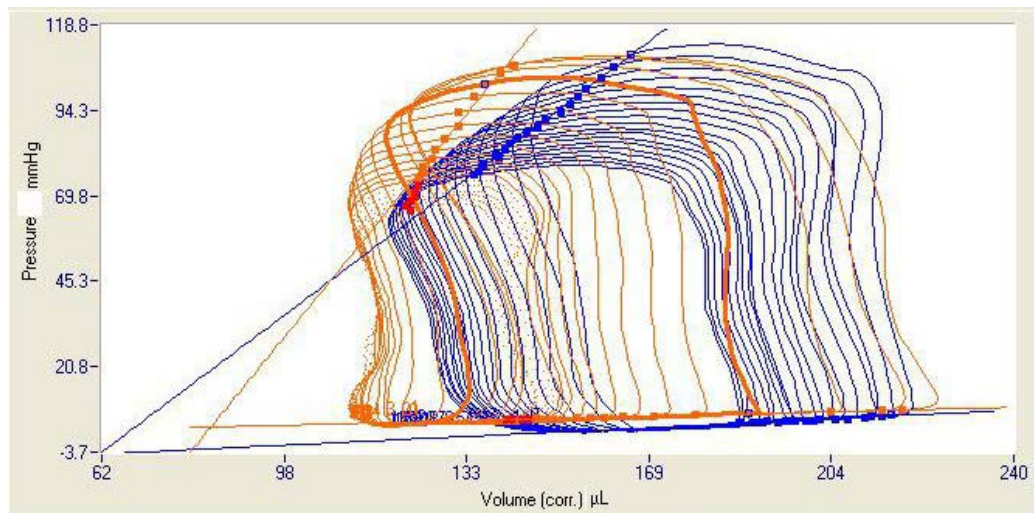


Figure 32 : Courbes pression-volume obtenues par cathéter de conductance chez deux rats ayant subi une ischémie-reperfusion myocardique.

En bleu, rat contrôle (LR12-scr). La pente de la droite joignant l'ensemble des points télésystoliques correspond au paramètre d'inotropisme Ees, réputé indépendant des conditions de charge. Pour ce rat, Ees = 1,11 mmHg.μL⁻¹ et Emax = 2,46. En orange, rat traité par LR 12. On constate une amélioration de la contractilité, illustrée par l'augmentation de la pente Ees, mesurée à 1,81 mmHg.μL⁻¹. Emax = 6,85.

Ces études chez le rat ont ainsi permis de démontrer que la modulation de la réponse inflammatoire par l'utilisation d'un peptide inhibiteur de TREM-1 limitait les phénomènes de remodelage ventriculaire post-IDM non reperfusé, et améliorait la contractilité myocardique lors de l>IDM revascularisé ou non.

DISCUSSION

Les observations marquantes de ce travail sont :

- I) **i)** La modulation de TREM-1 par le peptide synthétique 'LR12' corrige l'hypotension et l'hyperlactatémie induites par le choc septique expérimental, **ii)** LR12 atténue la dysfonction myocardique associée au sepsis, **iii)** prévient l'hyporéactivité vasculaire associée **iv)** TREM-1 est exprimé et up-régulé par les cellules endothéliales vasculaires et microvasculaires (pulmonaires et hépatiques) et sa modulation par LR12 possède un effet protecteur sur la dysfonction endothéliale.
- II) **i)** TREM-1 est exprimé dans le myocarde. Au cours de l'infarctus, **ii)** TREM-1 est up-régulé, **iii)** contrôle le recrutement et l'activation leucocytaire. **iv)** LR12 module ce recrutement, réduit la réponse inflammatoire, limite le remodelage ventriculaire et améliore la fonction cardiaque.

RÉACTIVITÉ VASCULAIRE, DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE & SEPSIS

LR12 AMÉLIORE LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE ET RÉDUIT LA LACTATÉMIE ARTÉRIELLE

Dans notre modèle expérimental de choc septique, 18 heures après l'induction de la péritonite, une hypotension artérielle marquée est présente, associée à un hyperlactatémie. Ces phénomènes sont centraux au cours du choc septique et sont retenus dans sa définition.

Les mécanismes de l'hypotension artérielle comprennent à la fois une atteinte vasculaire et une défaillance myocardique.

La dysfonction vasculaire se traduit par une hyporéactivité à la fois en termes de contractilité mais également de relaxation, témoignant de l'atteinte endothéliale. La cause de l'atteinte myocardique est moins clairement élucidée, faisant essentiellement intervenir des médiateurs inflammatoires systémiques; l'ischémie myocardique demeurant exceptionnelle¹⁸⁶.

L'hyperlactatémie a elle aussi plusieurs origines : **i)** hypoxie tissulaire en rapport avec un bas débit régional en rapport soit avec une insuffisance contractile myocardique, soit avec

une dysfonction endothéliale locale et/ou systémique, **ii**) accélération de la glycolyse aérobie médiée par une stimulation β -adrénergique, **iii**) une production accrue par les cellules immunes¹⁸⁷.

Au sein du laboratoire, il a été largement démontré que la modulation de TREM-1, par l'intermédiaire d'un peptide synthétique 'LR12', atténuait l'hypotension artérielle, améliorait la dysfonction d'organe et protégeait du décès¹⁸⁸. Dans notre modèle, nous retrouvons cet effet de LR12 sur la pression artérielle et constatons de plus une absence d'hyperlactatémie marquée chez les animaux traités. Par ailleurs, LR12 atténuait largement la dysfonction myocardique.

Afin d'expliquer ces phénomènes protecteurs, nous avons tout d'abord cherché à comprendre l'effet de LR12 au niveau vasculaire.

LR12 ATTÉNUÉ L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE INDUITES PAR LE SEPSIS

Pour comprendre le mécanisme par lequel le LR12 a amélioré la pression artérielle *in vivo*, nous avons cherché à nous affranchir des paramètres cardiaques. Pour cela, nous avons isolé des artères aortiques et mésentériques d'animaux septiques et nous avons étudié leur réactivité vasculaire *ex vivo*.

Différents modèles expérimentaux de choc septique s'accompagnent d'une hyporéactivité vasculaire avec une altération de la réponse aux agents pharmacologiques et une désensibilisation de leurs récepteurs. Cette hyporéactivité vasculaire observée au cours du choc septique est principalement en relation avec une forte production du NO inductible^{189,190,191}.

Dans notre modèle expérimental, la péritonite a bien induit une hyporéactivité vasculaire et une désensibilisation des récepteurs à la phényléphrine avec une surexpression de iNOS. L'hyporéactivité vasculaire induite par la péritonite est reversée par un traitement par LR12 aussi bien au niveau des artères de conductance qu'au niveau des artères de résistance. Cette prévention pourrait être en relation avec la baisse de la surexpression d'iNOS induite par LR12.

Au niveau vasculaire, l'un des facteurs de relaxation le plus important est le NO produit par l'activation de eNOS : le NO d'origine endothéliale régule le tonus musculaire, l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes. L'expression de eNOS est stimulée par de multiples facteurs incluant les forces de cisaillement, VEGF, l'acétylcholine, les œstrogènes^{192,193}. Il a été rapporté que l'activation de eNOS est un

processus entièrement dépendant de la phosphorylation du résidu sérine induite par Akt¹⁹⁴. Cette dernière permet la dissociation de eNOS de la membrane plasmique et rend ainsi possible son activation.

Les agonistes récepteur-dépendants (tel que l'Ach) se fixent sur des récepteurs endothéliaux qui leur sont spécifiques (récepteurs muscariniques pour l'Ach), et induisent la transduction du signal qui active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire principalement calcium dépendantes. Ce processus va stimuler eNOS générant ainsi une production de NO. Ce dernier a la capacité de traverser la membrane et de diffuser très rapidement dans la circulation sanguine ou dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMV) sous-jacentes. Dans celles-ci le NO active la guanylate cyclase soluble (sGC) à l'origine de la production de mono-phosphate 3,5 cyclique (GMPc) qui relaxe les CML et induit une vasorelaxation. Cette vasorelaxation nécessite un endothélium présent et fonctionnel et est appelée vasorelaxation endothélium dépendante.

Une étude de Chauchan SD *et al*¹⁹⁵ a montré que le NO dérivé de iNOS, joue un rôle clé dans la dysfonction endothéliale au niveau des artères aortiques et mésentériques dans un modèle endotoxinique chez la souris. Celle-ci se traduit par une atteinte du relâchement des vaisseaux à l'Ach et au flux. La dysfonction endothéliale est associée à une réduction de la biodisponibilité du NO d'origine endothéliale, à une altération de la production des prostanoïdes, et à une atteinte de la voie EDHF (endothélium-dépendent hyperpolarisation factor), tous ces mécanismes pouvant agir indépendamment ou en synergie.

Une autre étude a rapporté une importante réduction de la phosphorylation de eNOS dans des artères mésentériques de lapins en sepsis, une altération des récepteurs de surface endothéliaux, et une modification de la voie de transduction du NO. Ces données de la littérature soutiennent nos résultats.

Dans notre modèle de péritonite, une dysfonction endothéliale est observée, traduite par une altération de la relaxation des vaisseaux via une diminution de la sensibilité des récepteurs endothéliaux à l'Ach. A l'échelle moléculaire cette atteinte fonctionnelle est exprimée par une baisse de l'activité de la NOS endothéliale en relation avec la faible expression de p-Akt. Le traitement par LR12 corrige cette dysfonction endothéliale avec une amélioration de la réponse à l'Ach et cela via la protection de la voie de la NOS

endothéliale. Le LR12 restaure l'expression de eNOS et sa phosphorylation ainsi que celle de Akt.

A côté de NOS, la voie des cyclooxygénases semble être aussi impliquée dans l'atteinte de la réactivité vasculaire. La voie des cyclooxygénases conduit à la formation de plusieurs médiateurs (PGE2, PGF2, PGI2, TX) qui, après activation d'un récepteur spécifique couplé à la protéine G, favorisent l'inflammation, altèrent le tonus vasomoteur et augmentent la perméabilité vasculaire. Certains ont un effet vasodilatateur et d'autres vasoconstricteurs. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'activité des COX2 est augmentée dans certains états inflammatoires et est induite dans les cellules par des cytokines pro-inflammatoires¹⁹⁶.

L'étude de Murakami Y *et al*¹⁹⁷ a montré que l'augmentation de la production de PGE2 est induite par le LPS, elle promeut l'expression des TREM-1. Ainsi, la PGE2 induit une sur-régulation de l'expression de TREM-1 qui peut jouer un rôle important dans le renforcement de la réponse médiée par les TLRs des macrophages stimulés par LPS. Il a été démontré que PGE2 diminue l'inflammation par répression de la production des cytokines pro-inflammatoires, et induction de la production des cytokines anti-inflammatoires et la libération de sTREM-1. PGE2 joue donc un rôle en tant que régulateur de la réponse inflammatoire à l'infection microbienne.

Nous observons une diminution de l'expression de COX1 chez les rats septiques. LR12 restaure l'expression de cette protéine constitutive, traduisant possiblement une préservation de la fonctionnalité endothéliale.

Une surexpression de la cyclooxygénase inductible (COX2) par la péritonite est observée chez les rats septiques. Le traitement par LR12 atténue cette surexpression (probablement via l'inhibition de l'activation de la voie NF-kB que nous avons démontré antérieurement dans un autre travail) et ainsi pourrait limiter la production de médiateurs lipidiques toxiques.

Aussi nos résultats plaident-ils en faveur d'une action protectrice de LR12 sur l'atteinte endothéliale et l'hyporéactivité vasculaire induite par le sepsis, vraisemblablement par modulation de la voie de TREM-1. Néanmoins, le mécanisme d'action vasculaire de LR12 demeure incertain : s'agit-il d'un mécanisme global de diminution de l'inflammation (réduction de l'ambiance inflammatoire systémique, réduction de l'infiltrat leucocytaire vasculaire), ou bien LR12 agit-il directement au niveau de l'endothélium ? Auquel cas TREM-1 est-il exprimé par les cellules endothéliales ? Son activation participe-t-elle à la dysfonction vasculaire et peut-elle être modulée par LR12 ?

LR12 AMÉLIORE L'HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE ET L'ATTEINTE ENDOTHÉLIALE IN VITRO

Pour s'affranchir de l'infiltrat leucocytaire et de l'environnement cytokinique, nous avons étudié la réactivité vasculaire d'aortes de souris saines. Nous avons pu montrer d'une part une nette atténuation de l'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS (en relation avec une réduction de l'activation de iNOS et COX2), mais également l'induction d'une telle altération en présence d'un anticorps agoniste de TREM-1. De manière importante, l'effet de LR12 était abrogé en l'absence de l'endothélium vasculaire.

Ces données suggèrent ainsi clairement un effet vasculaire direct de l'activation de TREM-1, indépendamment de l'existence d'un infiltrat inflammatoire (qui n'existe pas *in vitro* en dehors des quelques macrophages résidants).

Ce mécanisme d'amélioration de l'atteinte vasculaire passe probablement par une protection endothéliale : reste donc à prouver l'existence de TREM-1 au niveau des cellules endothéliales.

TREM-1 EST EXPRIMÉ PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET EST FONCTIONNEL

Aussi bien *ex vivo* que *in vitro*, nous avons pu montrer la présence de TREM-1 au niveau des cellules endothéliales issues des aortes de souris ou d'artères mésentériques de rat. L'expression endothéliale basale de TREM-1 est faible mais rapidement up-régulée en présence de LPS.

Du fait de l'hétérogénéité phénotypique endothéliale, nous avons également étudié son expression et sa régulation au niveau des cellules endothéliales microvasculaires. Deux territoires sont accessibles : le foie et le poumon.

Nous avons pu démontrer la présence de TREM-1 au niveau de ces cellules. Par ailleurs, son expression était également up-réglée *in vivo* au cours du sepsis et *in vitro* après stimulation par LPS. La modulation de TREM-1 par LR12 réduisait l'activation de ces cellules microvasculaires induite par le LPS. Cet effet protecteur endothélial de LR12 pourrait en partie expliquer l'atténuation de la l'hyperperméabilité et des dommages d'organes associés au sepsis, phénomènes que nous avons constaté au cours de plusieurs modèles expérimentaux.

Si à première vue infarctus du myocarde et choc septique ont peu à voir, il est devenu clair ces dernières années que l'ischémie myocardique était également une pathologie inflammatoire. En fait, les mêmes effecteurs cellulaires interviennent : neutrophiles, monocytes/macrophages... De manière similaire au sepsis, l'importance de la réaction inflammatoire initiale ainsi que sa durée vont influencer sur le pronostic après un infarctus du myocarde (IDM) en conditionnant notamment l'étendue de la zone ischémique et le remodelage ventriculaire qui, s'il est trop important va conduire au développement d'une insuffisance cardiaque. Ainsi, tout comme au cours du sepsis, un contrôle précis de l'activation leucocytaire est nécessaire à une cicatrisation correcte tout en évitant les effets délétères d'une réponse inflammatoire exagérée.

L'INFARCTUS DU MYOCARDE EST UNE PATHOLOGIE INFLAMMATOIRE

INFLAMMATION ET ISCHÉMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE

Le rôle potentiellement délétère de l'immunité innée au cours de la reperfusion myocardique a été mis en évidence depuis environ 30 ans. En effet, dès 1983, Romson et al²⁵ ont rapporté une diminution de plus de 40% de la taille de l'infarctus chez des chiens reperfusés après déplétion en polynucléaires neutrophiles. On sait aujourd'hui que l'inflammation initiée en réponse à l'atteinte myocardique ischémique est la cause principale des lésions de reperfusion¹⁹⁸. Lors de la reperfusion, les cellules nécrotiques relarguent quantité de signaux de « danger ». Ces signaux endogènes de danger ou DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) sont responsables d'une activation de l'immunité innée, telle que postulée par Matzinger¹⁹⁹.

L'implication du système du complément dans le myocarde infarci a été démontrée pour la première fois en 1971²⁰⁰. Depuis, le rôle du complément dans les lésions de reperfusion myocardiques a été bien établi. Les trois voies d'activation – voie classique, voie des lectines et voie alterne – sont impliquées mais des études récentes concluent à l'importance particulière de la voie des lectines²⁰¹. L'activation du complément permet également le recrutement des monocytes/macrophages qui vont alors infiltrer le myocarde infarci dès la première heure de reperfusion²⁰².

Les polynucléaires neutrophiles répondent de façon similaire à l'ischémie-reperfusion myocardique et à l'invasion bactérienne. Ils interagissent rapidement avec les cellules endothéliales coronaires et les cellules parenchymateuses (cardiomyocytes) et engendrent des lésions létales de reperfusion directement via la production d'ERO, de protéases, et indirectement en entretenant le processus inflammatoire¹³⁵.

Tous les effecteurs de l'immunité innée sont donc recrutés dans le myocarde lors de la reperfusion. De plus en plus d'études semblent par ailleurs conforter le rôle prépondérant des TLRs comme « chefs d'orchestre » de cette réponse inflammatoire, tant pour son initiation que pour son entretien voire son amplification exagérée²⁰³. Les TLRs sont exprimés par les principales cellules concernées lors de la reperfusion myocardique, à savoir les leucocytes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes. Lors de la fixation de leur ligand, les DAMPs, toutes ces cellules connaissent la même voie de signalisation cellulaire, à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle positif entre inflammation et mort cardiomyocytaire.

Les interactions leucocytes/cardiomyocytes/cellules endothéliales entraînent la mort des cardiomyocytes, qui elle-même conduit au relargage des mêmes cytokines qui activent et recrutent les leucocytes¹⁹⁸.

Au niveau myocardique, deux TLRs sont particulièrement étudiés : TLR2 et TLR4. Les TLR2 présents dans le compartiment parenchymateux (i.e. cardiomyocytes et cellules endothéliales) et sur les cellules circulantes sont associés à des lésions de reperfusion myocardique différentes.

Dans un modèle d'ischémie-reperfusion ex vivo, Sakata et al ont retrouvé une altération significative de la contractilité myocardique chez les souris Wild Type (WT) en comparaison à des souris KO TLR2, mais sans différence sur la taille de l'infarctus.

Ces données indiquent une participation des TLR2 cardiomyocytaires dans la sidération myocardique, qui est une des composantes des lésions de reperfusion⁹⁸. La dysfonction endothéliale caractérisant le phénomène de « no-reflow » semble être médiée par les TLR2 parenchymateux et circulants puisqu'une altération de la relaxation vasculaire coronaire a pu être mise en évidence chez des souris chimériques WT avec moelle osseuse TLR2^{-/-} et chez des souris TLR2^{-/-} avec moelle osseuse WT²⁰⁴. Les TLR2 présents sur les cellules parenchymateuses et circulantes participent donc à la dysfonction endothéliale via un cercle vicieux faisant interagir les leucocytes et les cellules endothéliales. Les lésions létales de reperfusion sont quant à elles entièrement liées à l'activation des TLR2 présents sur les cellules circulantes. Arslan *et al* ont récemment rapportés l'absence de diminution de la taille de l'infarctus chez des souris chimériques TLR2^{-/-} avec moelle osseuse WT, alors que les souris WT avec moelle osseuse TLR2^{-/-} présentaient un infarctus de taille significativement plus faible, comparable à celle constatée chez les souris double KO²⁰⁵. Les TLR4 sont également impliqués dans les lésions létales de reperfusion. Oyama et al ont retrouvé une diminution de la zone infarctée chez des souris KO TLR4^{-/-} sur un modèle d'IDM reperfusé, en comparaison à des souris WT⁹⁷.

Les effets néfastes de la réponse inflammatoire précocement initiée dans le myocarde à la phase aigüe de la reperfusion se poursuivent lors de la phase subaigüe de cicatrisation, conduisant au remodelage ventriculaire.

LE REMODELAGE VENTRICULAIRE

Le remodelage ventriculaire est un processus progressif qui débute très précocement après l'IDM, 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 ». 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 et se dilatent. 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, fait le lit de l'insuffisance cardiaque²⁰⁶.

Très rapidement après l'IDM, vers le quatrième jour, la zone infarctée commence à s'étirer, en subissant une dilatation aiguë et un amincissement pariétal, sans nécrose additionnelle. Au sein de ce myocarde infarcté, de multiples mécanismes contribuent à ces modifications morphologiques, tels que l'étirement des cardiomyocytes, la réduction des espaces intercellulaires et la dégradation de la matrice extracellulaire²⁰⁷. A distance de la zone infarctée, le myocarde « sain » va également subir un processus de remodelage durant plusieurs mois, combinant le développement d'une hypertrophie excentrique compensatrice et une expansion longitudinale avec amincissement pariétal.

MÉCANISMES NEUROHORMONAUX

Les systèmes bêta-adrénergiques (S- β A) 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 structurels et géométriques du remodelage.

L'activation chronique de la stimulation bêta-adrénergique est à l'origine d'effets délétères au niveau myocardique, notamment en induisant une hypertrophie via la stimulation de récepteurs de type β 1. De nombreuses études cliniques ont confirmé le bénéfice en terme de mortalité mais également en terme de limitation du remodelage lors du blocage chronique du S- β A par des traitements bêta-bloquants^{208,209}.

Le SRAA, principalement par l'intermédiaire de ses effecteurs finaux, l'angiotensine II et l'aldostérone, exerce de nombreux effets cardiaques. 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. L'aldostérone joue également un rôle dans le remodelage ventriculaire en favorisant la fibrose myocardique, par une stimulation de la synthèse de collagène²¹⁰. De même que pour le S- β A, le blocage du SRAA est bénéfique en terme 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'angiotensine²¹¹, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II²¹², anti-aldostérones²¹³. 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 ischémique²¹⁴.

INFLAMMATION ET REMODELAGE VENTRICULAIRE

De nombreuses preuves scientifiques s'accumulent pour confirmer le rôle essentiel de la réponse immunitaire dans le processus de cicatrisation myocardique après IDM, tant dans sa composante physiologique que pathologique conduisant au remodelage²¹⁵. Les traitements bloquant les systèmes neurohormonaux précédemment cités pourraient en effet exercer une partie de leurs effets bénéfiques en interférant avec la cascade inflammatoire. L'utilisation des bêta-bloquants, par exemple, diminue le niveau d'expression de l'interleukine-1, cytokine pro-inflammatoire, dans le myocarde infarcté²¹⁶. Le processus de cicatrisation myocardique est classiquement divisé en quatre phases qui se chevauchent²¹⁷ :

- de la 6^{ème} heure au 4^{ème} jour, les cardiomyocytes meurent, par nécrose et par apoptose (phase 1) ;
- une réponse inflammatoire aiguë débute à partir de la 12^{ème} heure après le début de l'ischémie avec migration de polynucléaires neutrophiles dans la zone infarctée, avec un pic de concentration à 24-48h. La principale fonction des polynucléaires neutrophiles est l'élimination des cardiomyocytes morts. Puis des monocytes/macrophages ainsi que des lymphocytes sont recrutés dans le myocarde infarcté et participent à la clairance des débris cellulaires (phase 2) ;
- à partir du 3^{ème} jour après l'IDM, du tissu de granulation commence à se former au niveau de la « zone grise », en bordure du tissu infarcté (phase 3) ;
- finalement, le remodelage physiologique aboutissant à la formation d'une cicatrice fibreuse débute deux semaines après l'IDM et s'achève après plusieurs mois (phase 4).

La cicatrisation myocardique apparaît donc comme un processus inflammatoire dynamique mettant en scène de nombreux intervenants ; la « guérison » optimale de la zone infarctée implique que cette inflammation soit circonscrite sur le plan spatial à la zone infarctée, et limitée dans le temps. Le remodelage ventriculaire pathologique correspond à une réponse inflammatoire non contenue dans le temps et/ou dans l'espace^{215,19}. Des études animales et humaines suggèrent par exemple l'implication non contenue spatialement de lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant les protéines contractiles telle

que la myosine comme antigène^{151,55}. L'engagement des TLRs a également été associé à un remodelage ventriculaire extensif. Shishido *et al* ont constaté une amélioration de la survie associée à une diminution de la fibrose dans le myocarde non infarci chez des souris KO TLR2^{-/-} ayant subi un IDM non reperfusé, en comparaison aux souris WT. Il n'y avait par ailleurs pas de différence entre la taille de la zone infarctée et le degré d'infiltration de l'infarctus par des cellules inflammatoires⁹⁹. Plus récemment, une étude a retrouvé une limitation du remodelage ventriculaire chez des souris KO TLR4^{-/-}²¹⁸.

La compréhension de la physiopathologie de l'infarctus, initialement perçu comme une pathologie purement mécanique par occlusion d'une artère coronaire, s'est progressivement modifiée au cours des dernières décennies jusqu'à aboutir au constat actuel : l'infarctus du myocarde est une pathologie inflammatoire, du développement de l'athérosclérose jusqu'au remodelage ventriculaire. Malgré des résultats expérimentaux encourageants, les essais cliniques de traitements visant à inhiber la réponse inflammatoire au cours de l'IDM n'ont pas obtenu les résultats escomptés.

Echecs des thérapeutiques anti-inflammatoires

Les résultats expérimentaux très encourageants des thérapeutiques visant à inhiber la réponse inflammatoire dans le myocarde infarci ont conduit à la réalisation de nombreux essais cliniques, qui se sont révélés soit délétères – par exemple lors de l'utilisation de fortes doses de méthylprednisolone à la phase aiguë²¹⁹ – soit équivoques. 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 infarctée²²⁰. Les mêmes résultats décevants ont été constatés avec l'utilisation d'un anticorps anti CD11/CD18²²¹. 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 thrombolysés²²² ou avant angioplastie^{223,224}. 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%²²⁵ et une amélioration de la morbi-mortalité dans le sous-groupe des patients reperfusés les plus précocement²²⁶. L'adénosine aurait 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 cardiomyocytes²²⁷.

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 et en préservant les processus réparateurs semble nécessaire¹⁹.

Ceci est d'ailleurs illustré par le caractère souvent ambivalent de nombreuses voies de signalisation de l'inflammation. Nous avons vu précédemment plusieurs études retrouvant un effet délétère de l'activation des voies de signalisation de TLR2 et TLR4, tant lors de la reperfusion que lors du remodelage ventriculaire. Mais au niveau myocardique, l'activation de ces voies n'est pas uniquement néfaste²²⁸.

L'implication de ces deux voies de signalisation dans le préconditionnement myocardique a été démontrée expérimentalement par différentes équipes. Les arguments en faveur du rôle bénéfique de l'immunité innée reposent sur des arguments plus anciens qui suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires confèrent une réponse cytoprotectrice de courte durée dans le cœur²²⁹. Des études récentes font le lien entre cette réponse cytoprotectrice et les voies de signalisation dépendantes des TLRs.

Il a par exemple été retrouvé un effet préconditionnant de l'activation de TLR4 par du LPS dans un modèle d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé de rat²³⁰. Ces effets cardioprotecteurs du LPS sont observés après 12 à 24 heures et font intervenir les voies moléculaires du préconditionnement tardif, notamment Akt, appartenant à la voie des *reperfusion-induced salvage kinase* (RISK)²³¹. De même, Frantz *et al* ont mis en évidence une augmentation de l'apoptose cardiomyocytaire induite par les espèces radicalaires de l'oxygène lors du blocage de TLR2, confirmant de nouveau le caractère cardioprotecteur de cette voie de signalisation²³². La participation de TLR2 dans le préconditionnement ischémique fait intervenir une voie dépendante de TIRAP (*Toll interleukin-1 receptor containing adaptor protein*) qui aboutit à l'inactivation par phosphorylation de GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*), prévenant ainsi l'ouverture du mPTP²³³.

Similitudes entre IDM et sepsis

Le choc septique est l'illustration la plus caricaturale des conséquences néfastes que peut entraîner le développement d'une réponse inflammatoire dérégulée. Tout comme pour l'IDM, 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 différentes molécules anti-inflammatoires : corticostéroïdes²³⁴, anti-TNF α ²³⁵, antagonistes du récepteur à l'interleukine-1²³⁶. Aucune efficacité significative n'a pu être démontrée en terme de mortalité.

De même, étant donné l'importance de TLR4 dans la reconnaissance du LPS, des inhibiteurs de TLR4 ont été développés, tel l'Eritoran, dont les résultats peu encourageants d'une étude clinique de phase II se sont confirmés lors de l'étude de phase III ACCESS²³⁷. L'échec global de telles stratégies chez l'Homme s'explique partiellement par le côté nécessaire et bénéfique de la réponse inflammatoire. 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 clinique²³⁸. 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 jamais d'une inhibition complète de la réponse inflammatoire. Des résultats dans le choc septique, confirment l'efficacité de cette approche^{177,187,238,239}. Compte tenu des similitudes précédemment exposées existant entre l'IDM et le sepsis, dans leur composante inflammatoire néfaste, nous avons voulu étudier l'implication de TREM-1 et l'effet de sa modulation au cours de l'IDM expérimental.

RÔLE DE TREM-1 ET DE SA MODULATION AU COURS DE L'IDM

TREM-1 EST EXPRIMÉ DANS LE MYOCARDE ET JOUE UN RÔLE DANS LA SURVIE APRÈS UN IDM

Au cours de l'IDM, l'expression de TREM-1, à la fois génique et protéique, est très rapidement up-réglée. Cette surexpression disparaît au cours de la première semaine post-infarctus. L'engagement de TREM-1, par l'intermédiaire d'un anticorps agoniste, s'associe à une surmortalité précoce, tous les décès survenant entre 24 et 48 heures. Inversement, l'administration de LR12 améliore la survie. De manière intéressante, LR12 permet également de réduire la taille de l'infarctus. Rappelons ici que même si l'étude n'était pas réalisée en aveugle, les animaux étaient randomisés au sein des différents groupes de traitement 1 heure après la ligature coronaire.

TREM-1 RÉGULE LE RECRUTEMENT ET L'ACTIVATION LEUCOCYTAIRE

Le déterminant majeur de la cicatrisation myocardique est la balance entre le type et la quantité de leucocytes recrutés au sein du tissu myocardique^{239,240,241,242}. Très rapidement après une ischémie, les neutrophiles s'accumulent au niveau du myocarde lésé et une telle extravasation, lorsqu'elle est excessive, est probablement délétère. La modulation de TREM-1 limite très fortement cette infiltration myocardique neutrophilique. Un tel phénomène a très récemment été décrit au cours de la pneumonie bactérienne pendant laquelle l'inhibition de TREM-1 bloquait la migration transépithéliale des neutrophiles²⁴³.

Peu de temps après les neutrophiles, le recrutement des monocytes inflammatoires Ly-6C^{high} survient, qui lorsqu'il est mal contrôlé conduit à l'extension de la zone infarctée et participe au remodelage ventriculaire. Cette sous-population inflammatoire est progressivement remplacée par un sous-type de monocytes dits réparateurs (Ly-6C^{low}) qui participe de la résolution de l'inflammation et de la réorganisation de la matrice extracellulaire⁴². La rate est un réservoir important de monocytes au cours de l'IDM⁴⁴.

Nous avons observé ici que TREM-1 était un médiateur important de cet efflux monocyttaire splénique et de leur infiltration myocardique. Par ailleurs, alors que l'inhibition de TREM-1 diminue la production de MCP-1, prévenant ainsi l'accumulation de cellules Ly-6C^{high}, elle ne compromet pas, voire augmente, le recrutement de monocytes Ly-6C^{low} médié par CX3CL1. Les lymphocytes sont également présents, quoique en quantité moindre, dans la zone infarctée et prolifèrent rapidement après l'infarctus.

Le rôle exact des sous-populations lymphocytaires n'est pas clair mais des données récentes suggèrent un effet délétère des cellules B²⁴⁴, alors que les lymphocytes CD4⁺ facilitent la cicatrisation et favorisent la transition monocyttaire Ly-6C^{high} - Ly-6C^{low}⁵². Tout comme pour les neutrophiles et les monocytes, TREM-1 semble important pour le recrutement lymphocytaire, notamment des cellules CD8⁺ cytotoxiques et B. Inversement, l'inhibition de TREM-1 s'accompagne d'une augmentation de recrutement lymphocytaire CD4⁺. Le réservoir lymphocytaire au cours de l'IDM n'est pas certain. Nous observons néanmoins que, tout comme pour les monocytes, la rate peut jouer ce rôle : en effet, le nombre de lymphocytes spléniques diminue rapidement après IDM. Une lymphopénie transitoire mais importante est également observée, ce phénomène étant totalement inhibé chez les animaux traités par LR12.

TREM-1 est un amplificateur de la réponse immune au cours de nombreuses pathologies inflammatoires^{149,245}. Nous observons que cela s'applique également au cours de l'IDM : l'inhibition de TREM-1 limite la réponse inflammatoire et l'activation cellulaire, telles qu'objectivées au niveau génique, protéique, et signalétique.

Même si le mécanisme précis reste à élucider, ces données suggèrent que TREM-1 joue un rôle important dans le recrutement leucocytaire, à la fois quantitativement et qualitativement, et dans la genèse de la réponse inflammatoire au cours de l'IDM.

LR12 LIMITE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE MYOCARDIQUE APRÈS IDM

L'inhibition de certaines MMP (matrix metalloproteinases) réduit le risque de ruptures cardiaques létales et l'importance du remodelage ventriculaire après IDM. Les cellules myéloïdes, et particulièrement les neutrophiles, sont une source majeure de MMP-9 au sein du myocarde infarci. L'inhibition de TREM-1, en réduisant l'infiltrat leucocytaire, réduit à la fois l'expression et l'activité de MMP-9. De manière concomitante, cela s'associe à activation accrue de TIMP-1 (un inhibiteur de la plupart des MMP). La résultante en est donc une réduction de l'activité protéasique au niveau du myocarde lésé : ceci pourrait se traduire par un remodelage ventriculaire moindre.

LR12 LIMITE LE REMODELAGE VENTRICULAIRE ET AMÉLIORE LA FONCTION CARDIAQUE APRÈS INFARCTUS

Au-delà de l'amélioration de la survie immédiate, le traitement de l'IDM a pour objectif d'éviter le développement de son évolution délétère vers une insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque va survenir lorsque la cicatrisation myocardique aura été imparfaite avec la survenue d'un remodelage ventriculaire important. Compte tenu des difficultés d'analyser précisément l'importance du remodelage et la fonction cardiaque chez la souris (les techniques d'imagerie sont imparfaites, l'échocardiographie est aléatoire compte tenu de la fréquence cardiaque très élevée, et les outils invasifs le sont trop !) nous avons utilisé différents modèles d'IDM chez le rat (une ischémie permanente par ligature coronaire définitive ou transitoire grâce à une ligature durant 1 heure) et avons utilisé deux techniques complémentaires : imagerie myocardique par microTEP au FDG et hémodynamique invasive par cathéter de conductance.

Six semaines après une ischémie myocardique permanente, la fonction ventriculaire gauche demeure sévèrement compromise et un remodelage important est présent. Une administration courte (5 jours) de LR12 permet de réduire cette dilatation ventriculaire et d'améliorer les fonctions cardiaques systolique et diastolique. Une telle amélioration de la fonction cardiaque est également présente en cas d'ischémie-reperfusion myocardique. Considérant que l'inhibition de TREM-1 conférée par LR12 n'est présente que durant 5 jours (LR12 ayant en effet une demi-vie très courte), nous émettons l'hypothèse que la modulation de la réponse inflammatoire initiale est responsable de cet effet tardif sur l'amélioration de la fonction ventriculaire.

Ces données permettent d'établir un lien entre la modulation de la réponse immune initiale et les conséquences délétères de l'IDM sur la fonction ventriculaire, démontrant ainsi la pertinence de l'administration de LR12 en termes fonctionnels.

PERSPECTIVES

Comme souvent, même si les résultats présentés ici sont très encourageants, de très nombreuses questions demeurent en suspens.

DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE ET MYOCARDIQUE AU COURS DU SEPSIS

FONCTION ENDOTHÉLIALE

Tout d'abord, la fonction endothéliale n'a réellement été appréciée ici qu'à travers l'exploration de la vasodilatation endothélium-dépendante médiée par l'acétylcholine. Certains outils, quoiqu'imparfaits, permettent une analyse complémentaire de la souffrance endothéliale au cours du sepsis : marqueurs solubles (vW, sICAM-1...) ou cellulaires (quantification du nombre de cellules endothéliales circulantes). Nous pourrions les utiliser ici.

L'interaction entre endothélium et leucocytes est une des premières étapes du recrutement leucocytaire au sein du foyer inflammatoire. Il serait intéressant d'analyser l'effet de la modulation de TREM-1 sur cette interaction cellule endothéliale-neutrophile/monocyte en condition de flux. Une technologie (Cellix®) acquise au laboratoire permet ce type d'expérimentation.

De manière constante nous avons pu observé une limitation de la défaillance d'organes et une amélioration de la mortalité des animaux septiques, quel que soit le modèle étudié : péritonite chez la souris et le rat, pneumonie chez le rat, péritonite chez le cochon. Compte tenu de l'implication de l'endothélium dans la physiopathologie du sepsis et la présence de TREM-1 en son sein, l'effet protecteur de LR12 passe-t-il par une modulation de TREM-1 myéloïde ou bien plutôt endothélial. Cette question n'est pas simplement d'ordre cognitif puisqu'une éventuelle modulation ciblée du TREM-1 endothélial permettrait de s'affranchir totalement de la crainte d'effets adverses en rapport avec une manipulation du système immunitaire (risque de super-infections par exemple). Afin de répondre à cette question, nous développons une souche de souris Trem-1^{-/-} - endothélium dépendant (système Cre-Lox Cdh5) que nous utiliserons dans des modèles d'endotoxémie et de péritonite.

FONCTION MYOCARDIQUE

Le mécanisme par lequel LR12 prévient la dysfonction myocardique induite par le sepsis n'est pas clair. Cela est-il simplement le reflet d'une réduction des concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires cardio-dépressantes, et notamment TNF- α , ou bien TREM-1 présent dans le myocarde joue-t-il directement un rôle dans la genèse de la cardiopathie septique. Un système de cœur isolé-perfusé permettra d'analyser indépendamment ces paramètres.

TREM-1 & INFARCTUS DU MYOCARDE

IMPLICATION DE TREM-1 AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

Afin de valider le rôle de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde, nous avons développé une souche de souris Trem-1^{-/-}. Les expérimentations présentées dans ce manuscrit seront répétées sur ces souris. Il n'est néanmoins pas certain que les données issues de ces nouveaux travaux soient aussi enthousiasmantes. En effet, au cours du sepsis, l'inhibition totale de TREM-1 s'accompagne d'un défaut de burst oxydatif, de clairance bactérienne, et *in fine* d'une surmortalité¹⁷³. Or, tout comme dans le sepsis, une réponse inflammatoire coordonnée est nécessaire au cours de l'IDM afin d'assurer la clairance des cellules nécrosées ou apoptotiques et de permettre la cicatrisation. Il est donc possible qu'une inhibition trop poussée de l'activation immune s'avère délétère.

L'EFFET PROTECTEUR DE LR12 IMPLIQUE-T-IL LES LYMPHOCYTES

Nous avons été surpris de constater que l'administration de LR12 s'accompagnait d'un effet sur la mobilisation des différentes sous-populations lymphocytaires : en effet, les lymphocytes n'expriment *pas* TREM-1. Cette action sur le trafic lymphocytaire peut être expliquée par une altération de la production de chimiokines (par les neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales). Compte tenu du rôle émergent des lymphocytes (notamment B et CD4⁺) au cours de l'IDM, l'effet protecteur de LR12 pourrait passer par une action (indirecte donc) sur ces cellules. La réponse à cette question sera apportée par l'étude de souris dépourvus de lymphocytes (Rag-1^{-/-}).

INFARCTUS CHEZ LE GROS ANIMAL

La translation des données issues d'expérimentations chez le rongeur à l'homme est souvent très décevante. En particulier, dans le domaine cardiovasculaire, l'anatomie et la physiologie cardiaques des rongeurs diffèrent de celle de l'homme. Afin d'approcher la pathologie humaine, nous avons mis au point un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique non invasif (occlusion coronaire transitoire via un ballonnet d'angioplastie mis en place par voie endovasculaire) chez le mini-pig. Ces animaux ont la particularité d'atteindre l'âge adulte avec un poids raisonnable (40-60kg) permettant leur manipulation. Notre modèle a également la particularité d'être long (18 heures) et de faire intervenir des médecins réanimateurs cliniciens, l'animal étant pris en charge (amines vasopressives, inotropes, remplissage vasculaire...) de manière similaire à un patient. Notre composé LR12 sera testé dans ce modèle.

EFFET DE LA MODULATION DE TREM-1 AU COURS D'AUTRES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

L'athérosclérose est typiquement une pathologie inflammatoire chronique dont le développement précède généralement la survenue d'un infarctus du myocarde. Nous collaborons avec le groupe que dirige le Dr Ait-Oufella (U970, Paris) afin d'étudier l'effet de LR12 au cours de l'athérosclérose.

A côté de l'IDM, l'accident vasculaire cérébral ischémique constitue un autre problème majeur de santé publique, tant la morbidité qui lui est associée est élevée. Nous avons mis au point un modèle d'AVC ischémique chez le rat et étudions actuellement l'implication de TREM-1 au cours de cette pathologie.

VALORISATION

L'ensemble des données rapportées dans ce manuscrit a fait l'objet d'un dépôt de brevet en collaboration avec l'Université de Lorraine et Inserm Transfert, actuellement en révision. La suite logique de notre travail sera donc de poursuivre le développement préclinique de notre molécule LR12 avec l'espoir de pouvoir à court terme réaliser une étude chez l'homme. Pour ce faire, plusieurs verrous doivent encore être levés. En particulier, s'il s'avère que l'administration prolongée (plusieurs semaines) de LR12 confère un effet protecteur encore plus significatif (et cela sera vraisemblablement le cas pour le traitement de l'athérosclérose), une formulation différente devra être envisagée. Nous avons commencé à y travailler.

BIBLIOGRAPHIE

1. Puymirat, E. *et al.* Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA* **308**, 998–1006 (2012).
2. Li, C. & Jackson, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **282**, C227–241 (2002).
3. Frangogiannis, N. G. & Entman, M. L. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 163–169 (2005).
4. Diwan, A. & Dorn, G. W., 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* **22**, 56–64 (2007).
5. Vanhoutte, D., Schellings, M., Pinto, Y. & Heymans, S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc. Res.* **69**, 604–613 (2006).
6. Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J. & Pfeffer, M. A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* **367**, 356–367 (2006).
7. De Gasparo, M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* **7**, 347–358 (2002).
8. Dendorfer, A., Dominiak, P. & Schunkert, H. ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol* 407–442 (2005).
9. Kiriakidis, S. *et al.* VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkkappaB kinase 2. *J. Cell. Sci.* **116**, 665–674 (2003).
10. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121–1135 (2007).
11. JENNINGS, R. B., SOMMERS, H. M., SMYTH, G. A., FLACK, H. A. & LINN, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* **70**, 68–78 (1960).
12. Niccoli, G., Marino, M., Spaziani, C. & Crea, F. Prevention and treatment of no-reflow. *Acute Card Care* **12**, 81–91 (2010).
13. Birnbaum, Leor & Kloner. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J. Thromb. Thrombolysis* **4**, 185–195 (1997).
14. Jennings, R. B., Schaper, J., Hill, M. L., Steenbergen, C., Jr & Reimer, K. A. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ. Res.* **56**, 262–278 (1985).
15. Steenbergen, C., Hill, M. L. & Jennings, R. B. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ. Res.* **57**, 864–875 (1985).
16. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
17. Kawakami, R. *et al.* Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation* **110**, 3306–3312 (2004).
18. Lindsey, M. *et al.* Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **103**, 2181–2187 (2001).

19. Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* **110**, 159–173 (2012).
20. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
21. Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**, 41–50 (2002).
22. Bournazou, I. *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J. Clin. Invest.* **119**, 20–32 (2009).
23. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
24. Mehta & Jayaram. Reperfusion Injury in Humans: Existence, Clinical Relevance, Mechanistic Insights, and Potential Therapy. *J. Thromb. Thrombolysis* **4**, 75–77 (1997).
25. Romson, J. L. *et al.* Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* **67**, 1016–1023 (1983).
26. Ducharme, A. *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **106**, 55–62 (2000).
27. Nahrendorf, M. *et al.* Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct. *Circ. Res.* **100**, 1218–1225 (2007).
28. Dewald, O. *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889 (2005).
29. Maekawa, Y. *et al.* Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1510–1520 (2004).
30. Morimoto, H. *et al.* Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ. Res.* **99**, 891–899 (2006).
31. Kaikita, K. *et al.* Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **165**, 439–447 (2004).
32. Hayashidani, S. *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2134–2140 (2003).
33. Leor, J. *et al.* Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation* **114**, 194–100 (2006).
34. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
35. Pfeffer, M. A. *et al.* Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N. Engl. J. Med.* **327**, 669–677 (1992).
36. Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161–1172 (1990).
37. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).

38. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
39. Sunderkötter, C. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417 (2004).
40. Swirski, F. K. *et al.* Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* **117**, 195–205 (2007).
41. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194 (2007).
42. Nahrendorf, M., Pittet, M. J. & Swirski, F. K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437–2445 (2010).
43. Tsujioka, H. *et al.* Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 130–138 (2009).
44. Jia, T. & Pamer, E. G. Immunology. Dispensable but not irrelevant. *Science* **325**, 549–550 (2009).
45. Porcheray, F. *et al.* Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **142**, 481–489 (2005).
46. Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266 (2006).
47. Sunderkötter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R. & Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 410–422 (1994).
48. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 103–111 (1993).
49. Guarda, E., Katwa, L. C., Myers, P. R., Tyagi, S. C. & Weber, K. T. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **27**, 2130–2134 (1993).
50. Dargas, G. *et al.* Prevalence of autoantibodies against contractile proteins in coronary artery disease and their clinical implications. *Am. J. Cardiol.* **85**, 870–872, A6, A9 (2000).
51. Moraru, M., Roth, A., Keren, G. & George, J. Cellular autoimmunity to cardiac myosin in patients with a recent myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **107**, 61–66 (2006).
52. Hofmann, U. *et al.* Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **125**, 1652–1663 (2012).
53. Mortensen, R. M. Immune cell modulation of cardiac remodeling. *Circulation* **125**, 1597–1600 (2012).
54. Cheng, X. *et al.* TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J. Clin. Immunol.* **25**, 246–253 (2005).
55. Varda-Bloom, N. *et al.* Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 2141–2149 (2000).
56. Frangogiannis, N. G., Smith, C. W. & Entman, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **53**, 31–47 (2002).

57. Roy, S. *et al.* Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. *Physiol. Genomics* **25**, 364–374 (2006).
58. Samuel, J.-L. *et al.* Genomics in cardiac metabolism. *Cardiovasc. Res.* **79**, 218–227 (2008).
59. Zannad, F., Adamopoulos, C., Mebazaa, A. & Gheorghide, M. The challenge of acute decompensated heart failure. *Heart Fail Rev* **11**, 135–139 (2006).
60. Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* **79**, 215–262 (1999).
61. Paul, S. Ventricular remodeling. *Crit Care Nurs Clin North Am* **15**, 407–411 (2003).
62. Borel, J. P. & Maquart, F. X. [Molecular mechanisms of wound scarring]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **56**, 11–19 (1998).
63. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **451**, 914–918 (2008).
64. Greiling, D. & Clark, R. A. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J. Cell. Sci.* **110 (Pt 7)**, 861–870 (1997).
65. Frangogiannis, N. G. *et al.* Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1468–1474 (2002).
66. Spinale, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* **87**, 1285–1342 (2007).
67. Peterson, J. T., Li, H., Dillon, L. & Bryant, J. W. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc. Res.* **46**, 307–315 (2000).
68. Romanic, A. M., Burns-Kurtis, C. L., Gout, B., Berrebi-Bertrand, I. & Ohlstein, E. H. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci.* **68**, 799–814 (2001).
69. Tao, Z.-Y., Cavasin, M. A., Yang, F., Liu, Y.-H. & Yang, X.-P. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci.* **74**, 1561–1572 (2004).
70. Sun, M. *et al.* Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* **110**, 3221–3228 (2004).
71. Lu, L., Zhang, J. Q., Ramires, F. J. & Sun, Y. Molecular and cellular events at the site of myocardial infarction: from the perspective of rebuilding myocardial tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 907–913 (2004).
72. Mukherjee, R. *et al.* Time-dependent changes in myocardial structure following discrete injury in mice deficient of matrix metalloproteinase-3. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 259–268 (2005).
73. Virag, J. I. & Murry, C. E. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am. J. Pathol.* **163**, 2433–2440 (2003).
74. Jugdutt, B. I. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* **108**, 1395–1403 (2003).
75. Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B. & Statkov, P. R. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* **173**, 548–550 (1971).
76. Grinnell, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J. Cell Biol.* **124**, 401–404 (1994).

77. Schellings, M. W. M., Pinto, Y. M. & Heymans, S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc. Res.* **64**, 24–31 (2004).
78. Heymans, S. *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat. Med.* **5**, 1135–1142 (1999).
79. Hayashidani, S. *et al.* Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1229–1235 (2003).
80. Peterson, J. T. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* **103**, 2303–2309 (2001).
81. Hayakawa, K. *et al.* Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation* **108**, 104–109 (2003).
82. Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J.-M. Septic shock. *Lancet* **365**, 63–78 (2005).
83. Shimaoka, M. & Park, E. J. Advances in understanding sepsis. *Eur J Anaesthesiol Suppl* **42**, 146–153 (2008).
84. Boyd, J. H., Mathur, S., Wang, Y., Bateman, R. M. & Walley, K. R. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc. Res.* **72**, 384–393 (2006).
85. Zhu, X. *et al.* Toll-like receptor 2 activation by bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein activates cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction. *Crit. Care Med.* **35**, 886–892 (2007).
86. Frantz, S. *et al.* Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* **104**, 271–280 (1999).
87. Knuefermann, P. *et al.* Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* **110**, 3693–3698 (2004).
88. Xu, X. H. *et al.* Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**, 3103–3108 (2001).
89. Faure, E. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 11058–11063 (2000).
90. Okamura, Y. *et al.* The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **276**, 10229–10233 (2001).
91. Jiang, D., Liang, J. & Noble, P. W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol. Rev.* **91**, 221–264 (2011).
92. Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. & Coffman, R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* **13**, 552–559 (2007).
93. Haas, B. *et al.* Adenosine reduces cell surface expression of toll-like receptor 4 and inflammation in response to lipopolysaccharide and matrix products. *J Cardiovasc Transl Res* **4**, 790–800 (2011).
94. Yang, J. *et al.* Expression of Toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells and its effects on patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Arch. Med. Res.* **41**, 423–429 (2010).

95. Ehrentraut, H. *et al.* The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur. J. Heart Fail.* **13**, 602–610 (2011).
96. Timmers, L. *et al.* Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ. Res.* **102**, 257–264 (2008).
97. Oyama, J. *et al.* Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* **109**, 784–789 (2004).
98. Sakata, Y. *et al.* Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H503–509 (2007).
99. Shishido, T. *et al.* Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2905–2910 (2003).
100. Kadokami, T., McTiernan, C. F., Kubota, T., Frye, C. S. & Feldman, A. M. Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J. Clin. Invest.* **106**, 589–597 (2000).
101. Meldrum, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. *Am. J. Physiol.* **274**, R577–595 (1998).
102. Frangogiannis, N. G. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1907–1939 (2006).
103. Kurrelmeyer, K. M. *et al.* Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5456–5461 (2000).
104. Frangogiannis, N. G. *et al.* Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**, 699–710 (1998).
105. Gwechenberger, M. *et al.* Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* **99**, 546–551 (1999).
106. Kukiela, G. L. *et al.* Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* **92**, 1866–1875 (1995).
107. Wollert, K. C. & Drexler, H. The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev* **6**, 95–103 (2001).
108. Gallucci, R. M. *et al.* Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J.* **14**, 2525–2531 (2000).
109. Möllmann, H., Nef, H. M. & Troidl, C. ‘Turning the right screw’: targeting the interleukin-6 receptor to reduce unfavourable tissue remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **87**, 395–396 (2010).
110. Lacraz, S., Nicod, L. P., Chicheportiche, R., Welgus, H. G. & Dayer, J. M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* **96**, 2304–2310 (1995).
111. GILBERT, R. P. Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin. *Physiol. Rev.* **40**, 245–279 (1960).
112. Stoclet, J. C. *et al.* Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* **100**, 107–112 (1999).
113. Cuzzocrea, S. *et al.* A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 73–81 (2006).
114. Levy, B. *et al.* Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med* **36**, 2019–2029 (2010).

115. Takakura, K., Taniguchi, T., Muramatsu, I., Takeuchi, K. & Fukuda, S. Modification of alpha1 -adrenoceptors by peroxyxynitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. *Crit. Care Med.* **30**, 894–899 (2002).
116. Cines, D. B. *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527–3561 (1998).
117. Aird, W. C. Endothelium as an organ system. *Crit. Care Med.* **32**, S271–279 (2004).
118. Matsuda, N. & Hattori, Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* **43**, 117–137 (2007).
119. De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J.-C., Dubois, M.-J. & Vincent, J.-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 98–104 (2002).
120. Astiz, M. E., DeGent, G. E., Lin, R. Y. & Rackow, E. C. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit. Care Med.* **23**, 265–271 (1995).
121. Linderkamp, O., Ruef, P., Brenner, B., Gulbins, E. & Lang, F. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr. Res.* **44**, 946–950 (1998).
122. De Backer, D. *et al.* Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Ann Intensive Care* **1**, 27 (2011).
123. Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* **38**, S26–34 (2010).
124. Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 536–545 (2008).
125. Ait-Oufella, H., Maury, E., Lehoux, S., Guidet, B. & Offenstadt, G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* **36**, 1286–1298 (2010).
126. Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* **9 Suppl 4**, S13–19 (2005).
127. Spronk, P. E., Zandstra, D. F. & Ince, C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* **8**, 462–468 (2004).
128. Levy, R. J. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock* **28**, 24–28 (2007).
129. Singer, M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit. Care Med.* **35**, S441–448 (2007).
130. Boueiz, A. & Hassoun, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc. Res.* **77**, 26–34 (2009).
131. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
132. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
133. Braunwald, E. & Kloner, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* **76**, 1713–1719 (1985).
134. Tsao, P. S., Aoki, N., Lefer, D. J., Johnson, G., 3rd & Lefer, A. M. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* **82**, 1402–1412 (1990).
135. Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**, 481–497 (2004).
136. DHALLA, N. S. & DUHAMEL, T. A. The Paradoxes of Reperfusion in the Ischemic Heart. *Heart Metab.*, **37**, 31-4.

137. Jordan, J. E., Zhao, Z. Q. & Vinten-Johansen, J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **43**, 860–878 (1999).
138. Lefer, A. M., Tsao, P. S., Lefer, D. J. & Ma, X. L. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* **5**, 2029–2034 (1991).
139. Devaux, C. *et al.* Chronic decrease in flow contributes to heart failure-induced endothelial dysfunction in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 302–305 (2004).
140. Landmesser, U. *et al.* Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**, 3073–3078 (2002).
141. Ma, H. *et al.* Vasculoprotective effect of insulin in the ischemic/reperfused canine heart: role of Akt-stimulated NO production. *Cardiovasc. Res.* **69**, 57–65 (2006).
142. Diefenbach, A. & Raulet, D. H. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 37–44 (2003).
143. Kubagawa, H., Burrows, P. D. & Cooper, M. D. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5261–5266 (1997).
144. Cantoni, C. *et al.* NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* **189**, 787–796 (1999).
145. Dietrich, J., Cella, M., Seiffert, M., Bühring, H. J. & Colonna, M. Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells. *J. Immunol.* **164**, 9–12 (2000).
146. Daws, M. R., Lanier, L. L., Seaman, W. E. & Ryan, J. C. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur. J. Immunol.* **31**, 783–791 (2001).
147. 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.* **164**, 4991–4995 (2000).
148. Bouchon, A., Hernández-Munain, C., Cella, M. & Colonna, M. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1111–1122 (2001).
149. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M. A. & Colonna, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103–1107 (2001).
150. Colonna, M. & Facchetti, F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J. Infect. Dis.* **187 Suppl 2**, S397–401 (2003).
151. Bleharski, J. R. *et al.* A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* **170**, 3812–3818 (2003).
152. Radsak, M. P., Salih, H. R., Rammensee, H.-G. & Schild, H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J. Immunol.* **172**, 4956–4963 (2004).
153. Gibot, S. *et al.* A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J. Exp. Med.* **200**, 1419–1426 (2004).
154. Gibot, S. *et al.* Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect. Immun.* **74**, 2823–2830 (2006).

155. Lanier, L. L. & Bakker, A. B. The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. *Immunol. Today* **21**, 611–614 (2000).
156. Sharif, O. & Knapp, S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* **213**, 701–713 (2008).
157. Tessarz, A. S. & Cerwenka, A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol. Lett.* **116**, 111–116 (2008).
158. Hara, H. *et al.* The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **8**, 619–629 (2007).
159. Hara, H. & Saito, T. CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **30**, 234–242 (2009).
160. Dower, K., Ellis, D. K., Saraf, K., Jelinsky, S. A. & Lin, L.-L. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **180**, 3520–3534 (2008).
161. Fortin, C. F., Lesur, O. & Fulop, T., Jr. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int. Immunol.* **19**, 41–50 (2007).
162. Ornatowska, M. *et al.* Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **293**, L1377–L1384 (2007).
163. Knapp, S. *et al.* Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J. Immunol.* **173**, 7131–7134 (2004).
164. Gibot, S. *et al.* Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit. Care Med.* **33**, 1787–1793 (2005).
165. Zheng, H. *et al.* MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands. *Eur. J. Immunol.* **40**, 162–171 (2010).
166. Zeng, H., Ornatowska, M., Joo, M. S. & Sadikot, R. T. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF-kappaB and PU.1. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2300–2308 (2007).
167. Gómez-Piña, V. *et al.* Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J. Immunol.* **179**, 4065–4073 (2007).
168. Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., von Landenberg, P., Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).
169. Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A. & Lanier, L. L. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat. Immunol.* **6**, 579–586 (2005).
170. Hamerman, J. A. *et al.* Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* **177**, 2051–2055 (2006).
171. Kelker, M. S., Debler, E. W. & Wilson, I. A. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å. *J. Mol. Biol.* **344**, 1175–1181 (2004).
172. Kelker, M. S. *et al.* Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J. Mol. Biol.* **342**, 1237–1248 (2004).
173. Gibot, S. *et al.* TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur. J. Immunol.* **37**, 456–466 (2007).

174. Gibot, S. *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 451–458 (2004).
175. Wiersinga, W. J. *et al.* Expression profile and function of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during melioidosis. *J. Infect. Dis.* **196**, 1707–1716 (2007).
176. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
177. Derive, M., Massin, F. & Gibot, S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a new therapeutic target during inflammatory diseases. *Self Nonself* **1**, 225–230 (2010).
178. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* **4**, 31–36 (2009).
179. Virag, J. A. I. & Lust, R. M. Coronary artery ligation and intramyocardial injection in a murine model of infarction. *J Vis Exp* (2011). doi:10.3791/2581
180. Baan, J. *et al.* Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* **70**, 812 (1984).
181. Suga, H., SAGAWA, K. & SHOUKAS, A. A. Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio. *Circulation Research* **32**, 314 (1973).
182. Kass, D. A., Yamazaki, T., Burkhoff, D., Maughan, W. L. & Sagawa, K. Determination of left ventricular end-systolic pressure-volume relationships by the conductance (volume) catheter technique. *Circulation* **73**, 586 (1986).
183. Glower, D. *et al.* Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation* **71**, 994–1009 (1985).
184. Burkhoff, D., Mirsky, I. & Suga, H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology* **289**, H501 (2005).
185. Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S. & Kass, D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protocols* **3**, 1422–1434 (2008).
186. Gibot, S., Lévy, B., Nevière, R., Cariou, A. & Lesur, O. [Myocardial dysfunction and septic shock]. *Med Sci (Paris)* **20**, 1115–1118 (2004).
187. Gibot, S. On the origins of lactate during sepsis. *Crit Care* **16**, 151 (2012).
188. Derive, M. *et al.* Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock* **39**, 176–182 (2013).
189. Stoclet, J. C., Muller, B., Andriantsitohaina, R. & Kleschyov, A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry Mosc.* **63**, 826–832 (1998).
190. O'Brien, A. J., Wilson, A. J., Sibbald, R., Singer, M. & Clapp, L. H. Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 351–360 (2001).
191. Kuo, J.-H., Chen, S.-J., Shih, C.-C., Lue, W.-M. & Wu, C.-C. Abnormal activation of potassium channels in aortic smooth muscle of rats with peritonitis-induced septic shock. *Shock* **32**, 74–79 (2009).
192. Bauersachs, J., Fleming, I., Scholz, D., Popp, R. & Busse, R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, but not nitric oxide, is reversibly inhibited by brefeldin A. *Hypertension* **30**, 1598–1605 (1997).
193. Dudzinski, D. M. & Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* **75**, 247–260 (2007).

194. Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. & Fleming, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol. Scand.* **168**, 81–88 (2000).
195. Chauhan, S. D. *et al.* Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J.* **17**, 773–775 (2003).
196. Bishop-Bailey, D., Larkin, S. W., Warner, T. D., Chen, G. & Mitchell, J. A. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 125–133 (1997).
197. Murakami, Y., Kohsaka, H., Kitasato, H. & Akahoshi, T. Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2. *J. Immunol.* **178**, 1144–1150 (2007).
198. Arslan, F., de Kleijn, D. P. V., Timmers, L., Doevendans, P. A. & Pasterkamp, G. Bridging innate immunity and myocardial ischemia/reperfusion injury: the search for therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1205–1216 (2008).
199. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
200. Hill, J. H. & Ward, P. A. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J. Exp. Med.* **133**, 885–900 (1971).
201. Jordan, J. E., Montalto, M. C. & Stahl, G. L. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* **104**, 1413–1418 (2001).
202. Birdsall, H. H. *et al.* Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* **95**, 684–692 (1997).
203. Arslan, F., Keogh, B., McGuirk, P. & Parker, A. E. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm.* **2010**, 704202 (2010).
204. Favre, J. *et al.* Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1064–1071 (2007).
205. Arslan, F. *et al.* 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* **121**, 80–90 (2010).
206. Gajarsa, J. J. & Kloner, R. A. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev* **16**, 13–21 (2011).
207. Weisman, H. F., Bush, D. E., Mannisi, J. A., Weisfeldt, M. L. & Healy, B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* **78**, 186–201 (1988).
208. Doughty, R. N. *et al.* Effects of carvedilol on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: the CAPRICORN Echo Substudy. *Circulation* **109**, 201–206 (2004).
209. Groenning, B. A. *et al.* Antiremodeling effects on the left ventricle during beta-blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2072–2080 (2000).
210. Iraqi, W. *et al.* 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* **119**, 2471–2479 (2009).

211. Konstam, M. A. *et al.* 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* **86**, 431–438 (1992).
212. McKelvie, R. S. *et al.* 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* **100**, 1056–1064 (1999).
213. Chan, A. K. Y. *et al.* Aldosterone receptor antagonism induces reverse remodeling when added to angiotensin receptor blockade in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 591–596 (2007).
214. McMurray, J. J. V. *et al.* 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.* **33**, 1787–1847 (2012).
215. Frangogiannis, N. G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res.* **58**, 88–111 (2008).
216. Deten, A., Volz, H. C., Holzl, A., Briest, W. & Zimmer, H.-G. Effect of propranolol on cardiac cytokine expression after myocardial infarction in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **251**, 127–137 (2003).
217. Blankesteyn, W. M. *et al.* Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol. Scand.* **173**, 75–82 (2001).
218. Riad, A. *et al.* Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J. Immunol.* **180**, 6954–6961 (2008).
219. Roberts, R., DeMello, V. & Sobel, B. E. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* **53**, 1204–206 (1976).
220. Baran, K. W. *et al.* Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation* **104**, 2778–2783 (2001).
221. Faxon, D. P. *et al.* 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.* **40**, 1199–1204 (2002).
222. Mahaffey, K. W. *et al.* 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* **108**, 1176–1183 (2003).
223. Granger, C. B. *et al.* Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation* **108**, 1184–1190 (2003).
224. APEX AMI Investigators *et al.* Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 43–51 (2007).
225. Ross, A. M. *et al.* A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1775–1780 (2005).

226. Kloner, R. A. *et al.* Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur. Heart J.* **27**, 2400–2405 (2006).
227. Headrick, J. P., Hack, B. & Ashton, K. J. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1797–1818 (2003).
228. Chao, W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1–12 (2009).
229. Mann, D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ. Res.* **91**, 988–998 (2002).
230. Brown, J. M. *et al.* Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2516–2520 (1989).
231. Zhu, X. *et al.* MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1900–1909 (2006).
232. Frantz, S., Kelly, R. A. & Bourcier, T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 5197–5203 (2001).
233. Dong, J.-W., Vallejo, J. G., Tzeng, H.-P., Thomas, J. A. & Mann, D. L. Innate immunity mediates myocardial preconditioning through Toll-like receptor 2 and TIRAP-dependent signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H1079–1087 (2010).
234. Lefering, R. & Neugebauer, E. A. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit. Care Med.* **23**, 1294–1303 (1995).
235. Abraham, E. *et al.* 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.* **29**, 503–510 (2001).
236. Fisher, C. J., Jr *et al.* 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* **271**, 1836–1843 (1994).
237. Barochia, A., Solomon, S., Cui, X., Natanson, C. & Eichacker, P. Q. Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **7**, 479–494 (2011).
238. Eichacker, P. Q. *et al.* Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 1197–1205 (2002).
239. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2013). doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.023
240. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* **339**, 161–166 (2013).
241. Ruparelia, N. *et al.* Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflamm. Res.* **62**, 515–525 (2013).
242. Tabas, I. & Glass, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**, 166–172 (2013).
243. Klesney-Tait, J. *et al.* Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J. Clin. Invest.* **123**, 138–149 (2013).

244. Ait-Oufella, H. *et al.* B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J. Exp. Med.* **207**, 1579–1587 (2010).
245. Gibot, S. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* **9**, 485–489 (2005).

